

Untersuchungen zur Endozytose und zum intrazellulären Transportweg von Ricin A (RTA) in Säuger- und Hefezellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Diplom-Biologe
Björn Becker

Saarbrücken

2012

Tag des Promotionskolloquiums: 07.12.2012

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Prüfungsausschuss:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Zimmermann

Vorsitzender: Prof. Dr. Uli Müller

Akademischer Mitarbeiter: Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abstract	7
1. Einleitung	8
1.1 Ricin	8
1.1.1 Vorkommen und Entdeckung.....	8
1.1.2 Funktion der Untereinheiten.....	9
1.1.3 Dreidimensionale Struktur	10
1.1.4 Klassifizierung von Ricin.....	12
1.1.5 Natürliche Ricin-Biosynthese in <i>Ricinus communis</i>	14
1.1.6 Anwendungsmöglichkeiten von Ricin	15
1.1.7 Intoxifikation von Säugerzellen	17
1.2 <i>S. cerevisiae</i> als Modell für den Toxintransport	23
1.3 Retrograder Transport in eukaryotischen Zellen.....	24
1.4 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Organismen	30
2.1.1 Bakterien	30
2.1.2 Hefen	31
2.1.3 Säugerzelllinien.....	32
2.2 Plasmide	32
2.2.1 Zwischenklonierung, Sequenzierung und PCR-Templates.....	32
2.2.2 Expressions- und Kontrollplasmide	33
2.2.3 Plasmidkarten	36
2.3 Materialien	38
2.3.1 Antikörper	38
2.3.2 RNA-Oligonukleotide	39
2.3.3 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	39
2.3.4 Restriktionsendonukleasen.....	40
2.3.5 Oligonukleotide	40
2.4 Kulturbedingungen und Nährmedien	42
2.4.1 Kultivierung von Bakterien.....	42
2.4.2 Kultivierung von Hefen.....	43
2.4.3 Kultivierung von Säugerzellen.....	45
2.4.4 Kryokulturen	45
2.5 Zellzahlbestimmung	45
2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	45
2.5.2 Bestimmung der Optischen Dichte	46
2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit.....	46
2.7 Standardmethoden zur DNA-Manipulation	46
2.7.1 Methoden zur Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	46
2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.7.3 DNA-Sequenzierung	50
2.7.4 DNA-Restriktion	50
2.7.5 Agarosegelelektrophorese	51

2.7.6	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	52
2.7.7	DNA-Ligation	52
2.8	Transformationsmethoden.....	53
2.8.1	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	53
2.8.2	Transformation von Hefen	54
2.8.3	Transfektion von Säugerzellen.....	55
2.9	Probenvorbereitung	56
2.9.1	Zellaufschluss und -extraktaufbereitung	56
2.9.2	Proteinfällung	57
2.10	Proteinreinigung	58
2.10.1	Ni ²⁺ -NTA Chromatographie.....	58
2.10.2	Umpufferung	59
2.11	Proteinbiochemische Methoden	60
2.11.1	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode.....	60
2.11.2	SDS-PAGE.....	60
2.11.3	Western-Analyse	63
2.11.4	Coomassie Färbung	65
2.12	Experimente zum ER-Import von RTA in Hefen	66
2.12.1	Radioaktive Markierung („pulse labeling“)	66
2.12.2	Direkte Autoradiographie.....	66
2.12.3	Phosphorimaging.....	66
2.12.4	Deglykosylierung mit EndoH.....	67
2.12.5	Proteasom-Inhibition mit MG132	67
2.13	<i>In vitro</i> Synthese von Proteinen	68
2.14	Toxizitätsbestimmungen bei Hefen.....	68
2.14.1	Wachstumstest.....	68
2.14.2	Sphäroplastierung von Hefezellen	68
2.14.3	Respirationstest	69
2.14.4	Toxizitätstest mittels Propidiumiodid	70
2.14.5	Mikrotiterplatten-GFP-Fluoreszenz-System	71
2.15	Toxizitätsbestimmung bei Säugerzellen.....	72
2.15.1	Trypanblau-Vitalitätstest.....	72
2.15.2	XTT basierter Vitalitätstest	73
2.15.3	WST-1-basierter Vitalitätstest.....	73
2.16	Sec61 α_1 - Silencing Experimente.....	74
2.17	Statistische Auswertung	76
2.18	Durchflusszytometrie (FACS).....	77
2.18.1	Quantitative Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	77
2.19	Indirekte Immunfluoreszenz	77
2.20	Mikroskopie-Methoden	78
2.20.1	Phasenkontrast-Mikroskopie	78
2.20.2	Fluoreszenzmikroskopie	78
2.20.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	79
3.	Ergebnisse	80
3.1	Herstellung von unterschiedlich modifizierten RTA-Varianten	81
3.1.1	Expression und Reinigung der modifizierten RTA-Varianten in <i>E. coli</i>	82
3.1.2	Nachweis der biologischen Aktivität der RTA-Varianten	84
3.1.3	Analyse der <i>in vivo</i> Toxizität von RTA _{His} ^{KDEL} in HeLa und HEK293T-Zellen ...	89
3.1.4	Studien zur <i>in vivo</i> Toxizität unterschiedlicher RTA-Toxinmutanten	90
3.1.5	Untersuchungen zur Aufnahme der RTA-Varianten in Säugerzellen.....	92

3.2	Herstellung fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten	93
3.2.1	Expression und Reinigung fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten	94
3.2.2	Nachweis der <i>in vivo</i> Toxizität von fluoreszenzmarkierten RTA-Varianten	96
3.2.3	Untersuchungen zur Toxinaufnahme und Kolokalisation mit Erd23.....	97
3.3	Intrazelluläre Expression von RTA-Varianten in Säugerzellen	102
3.3.1	Etablierung und Optimierung des Transfektionssystems	103
3.3.2	Nachweis der <i>in vivo</i> Toxizität in HeLa-Zellen	104
3.3.3	Nachweis der intrazellulären Expression von RTA mittels Immunfluoreszenz ..	105
3.4	Auswirkung des Sec61 α -Knockdowns auf die Toxizität von RTA	107
3.4.1	Einfluss der Sec61 α -Depletion auf die Toxizität der RTA-Varianten	107
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl von siRNA behandelten Zellen.....	111
3.4.3	Biochemischer Nachweis des Sec61 α -Knockdown	113
3.5	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Toxizität von RTA in Hefen	116
3.5.1	Respirationstest zum Nachweis der <i>in vivo</i> Toxizität in Hefen	116
3.5.2	Bestätigung der <i>in vivo</i> Toxizität mittels PI-Fluoreszenz-Test	119
3.5.3	Effekte verschiedener Deletionsmutanten auf die <i>in vivo</i> Toxizität von RTA....	120
3.6	Untersuchungen zum retrograden Transport von RTA in Hefen	122
3.6.1	Validierung des GFP-Reporter-Testsystems	124
3.6.2	Screening von Mutanten mit Defekten im retrograden Transport	127
3.6.3	Untersuchungen zur Verwendung des Testsystems für hefespezifische Toxine	133
3.7	Untersuchungen zum ER-Import von K28pp _{SS} -RTA in Hefen	134
3.7.1	Untersuchungen zur Toxizität von K28pp _{SS} -RTA in Hefen	135
3.7.2	<i>In vitro</i> Translation der verschiedenen RTA-Varianten.....	136
3.7.3	Markierungsexperimente („Pulse-Labeling“) zum Nachweis des ER-Imports...	138
4.	Diskussion.....	140
	Herstellung unterschiedlich modifizierter RTA-Varianten.....	142
	Biochemischer Nachweis der Toxinaufnahme.....	147
	Herstellung fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten.....	148
	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolokalisation von RTA und Erd23.....	151
	Intrazelluläre RTA-Expression in Säugerzellen.....	157
	Beteiligung von Sec61 α an der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA.....	160
	Nachweis der Sensitivität von Hefesphäroplasten gegenüber RTA.....	163
	Untersuchung zum retrograden Transport von RTA in Hefen.....	166
	ER-Importstudien von K28pp _{SS} -RTA in Hefen	178
5.	Ausblick.....	180
6.	Zusammenfassung.....	183
7.	Literatur	185
8.	Veröffentlichungen.....	201
	Erklärung	202
	Danksagung.....	203
	Lebenslauf	206

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	ERAD	ER-assoziierte Degradation
Amp	Ampicillin	GLB	„gel loading buffer“
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz	GTE	Glukose-Tris-EDTA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	HRP	„horseradish peroxidase“
AS	Aminosäure	Kan	Kanamycin
ATP	Adenosintriphosphat	Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“	kb	Kilobasepaare
bp	Basenpaar	kDa	Kiloodalton
BSA	Bovines Serumalbumin	LB	„lysogeny broth“
C-Term	Carboxy-Terminus	MBA	Methylenblau-Agar
CLSM	„confocal laser scanning microscopy“	MCS	„multiple cloning site“
COP	„coat protein complex“	LiAc	Lithiumacetat
Da	Dalton	N-Term	Amino-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid	OD	Optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ORF	„open reading frame“
DTT	Dithiothreitol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PBS	„phosphat buffered saline“
d/o	„drop out“	PCR	„polymerase chain reaction“
ds	doppelsträngig	PEG	Polyethylenglykol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PI	Propidiumiodid
EF-2	Elongationsfaktor 2	PVDF	Polyvinylidenfluorid
eGFP	„enhanced green fluorescence protein“	RIP	Ribosomen inaktivierende Proteine
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease	TE	Tris-EDTA
rpm	„revolutions per minute“	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
QDs	Quantum dots	TGN	„trans-golgi-network“
RTA	A-Untereinheit von Ricin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
RTB	B-Untereinheit von Ricin	UV	Ultraviolett
SC	„synthetic complete“	v/v	„volume per volume“
SDS	Natriumdodecylsulfat	w/o	„with out“
SRL	α -Sarcin/Ricin Loop	WT	Wildtyp
SRP	„signal recognition partikel“	w/v	„weight per volume“
SS	Signalsequenz	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ss	„single strand“, einzelsträngig	yEGFP	„yeast enhanced GFP“
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	YPD	„yeast extract peptone dextrose“
TBE	Tris-Borsäure-EDTA	YPG	„yeast extract peptone galactose“
TBS	„tris buffered saline“	YNB	„yeast nitrogen base“

Ein- bzw. Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A (Ala)	Alanin	I (Ile)	Isoleucin	R (Arg)	Arginin
C (Cys)	Cystein	K (Lys)	Lysin	S (Ser)	Serin
D (Asp)	Aspartat	L (Leu)	Leucin	T (Thr)	Threonin
E (Glu)	Glutamat	M (Met)	Methionin	V (Val)	Valin
F (Phe)	Phenylalanin	N (Asn)	Asparagin	W (Trp)	Tryptophan
G (Gly)	Glycin	P (Pro)	Prolin	Y (Tyr)	Tyrosin
H (His)	Histidin	Q (Gln)	Glutamin	X	beliebige Aminosäure

Abstract

Die katalytische A-Untereinheit (RTA) des Ribosomen-inaktivierenden Pflanzentoxins Ricin inhibiert die eukaryotische Proteinbiosynthese durch die Depurinierung der 28S rRNA, während die B-Untereinheit (RTB) für die Bindung an die Zielzelle verantwortlich ist. Da die retrograde Transportroute des Toxins nur teilweise verstanden ist, sollte der intrazelluläre Transport verschiedener RTA-Varianten in Säuger- und Hefezellen näher analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die toxische Wirkung von extern appliziertem RTA auf Hefesphäroplasten gezeigt werden. Des Weiteren wurden neuartige Testsysteme zur Untersuchung des retrograden Toxintransports im Modellorganismus Hefe etabliert, mit deren Hilfe auffällige Gemeinsamkeiten zwischen Säuger- und Hefezellen festgestellt wurden. Zudem konnte belegt werden, dass RTA^{HDEL} im Vergleich zu RTA^{KDEL} eine stärkere Toxizität in Hefen induziert. Neben dem Nachweis der Toxinaufnahme durch fluoreszenzmarkierte RTA-Fusionen wurden auch neue Hinweise auf eine Interaktion von RTA^{HDEL} mit dem HDEL-Rezeptor Erd23 in Säugerzellen erbracht. Abschließend konnte mittels RNA-Interferenz demonstriert werden, dass Sec61α bei der Retrotranslokation von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} im Säuger eine Rolle spielt. Die vorliegende Arbeit eröffnet somit neue Möglichkeiten, den Transport von RTA in Hefe- und Säugerzellen zu analysieren.

The catalytic A-subunit (RTA) of the ribosome-inactivating plant toxin ricin inhibits eukaryotic protein biosynthesis by depurination of the 28S rRNA, whereas the B-subunit (RTB) is required for binding to target cells. Since the retrograde toxin transport route is only partly understood, the intracellular transport of different RTA variants should be analyzed in mammalian and yeast cells. In this study, the toxic effect of externally applied RTA against yeast spheroplasts was shown for the first time. Furthermore, novel yeast based bioassays were established to elucidate the toxin trafficking in the model organism yeast. These assays revealed striking similarities between RTA transport in yeast and in mammalian cells. It was further demonstrated that RTA^{HDEL} induced a stronger toxicity against yeast than RTA^{KDEL}. In addition to the confirmation of the toxin uptake by fluorescent RTA fusions, further experimental evidence also suggests the interaction of RTA^{HDEL} with the mammalian HDEL-receptor Erd23. Finally, it was demonstrated by RNA interference that Sec61α plays a role in the retrotranslocation of RTA^{HDEL} and RTA^{KDEL} in mammalian cells. Hence, this study facilitates novel options to analyze the transport of RTA in yeast and mammalian cells.

1. Einleitung

In der modernen Medizin stellt die Intoxifikation mit bakteriellen und pflanzlichen Toxinen ein zunehmendes Problem dar. Zu den wohl bekanntesten bakteriellen Toxinen zählen dabei das Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* sowie das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* (Badizadegan *et al.*, 2004; Johannes und Römer, 2010; Sandvig und van Deurs, 2002a). Neben diesen stellt vor allem die Infektion mit Shiga-„like“-Toxin produzierenden *Escherichia coli* Stämmen wie z. B. den enterohämorrhagischen *E. coli* Stämmen (EHEC) ein wachsendes Gesundheitsproblem dar (Ferens und Hovde, 2011; Karmali, 2004; Tarr *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011; Zoja *et al.*, 2010). Auch eine Vielzahl von Pflanzen sind in der Lage, potente Toxine wie Ricin, Abrin oder Modeccin zu produzieren (Dickers *et al.*, 2003; Sandvig *et al.*, 2010b; Sandvig und van Deurs, 2002a). In Pflanzen dienen sie meist zur Abwehr von Fressfeinden oder zur Bekämpfung von Viren (Lord *et al.*, 2005; Parikh und Tumer, 2004). Die Intoxifikation mit Pflanzentoxinen erfolgt beim Menschen in der Regel unabsichtlich durch den Verzehr von Samen oder kontaminierten Nahrungsmitteln, was jedoch häufig zum Tod der Betroffenen führt (Dickers *et al.*, 2003). Zudem stellt vor allem das Pflanzentoxin Ricin eine ernstzunehmende Bedrohung dar, da es für bioterroristische Zwecke missbraucht und als terroristische Waffe eingesetzt werden kann (Patocka und Streda, 2006; Schep *et al.*, 2009). Um die Intoxifikation mit Ricin zukünftig effizienter behandeln sowie geeignete Gegenmittel entwickeln zu können, ist es notwendig, dessen Aufnahme und intrazelluläre Transportmechanismen im Detail zu charakterisieren und zu verstehen.

1.1 Ricin

1.1.1 Vorkommen und Entdeckung

Im Laufe der Evolution hat die Pflanze *Ricinus communis* (Wunderbaum) einen sehr effektiven Mechanismus zum Schutz vor potentiellen Fressfeinden entwickelt. Die zur Familie der *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächse) gehörende Pflanze produziert dazu das Pflanzentoxin Ricin und speichert es im Endosperm reifer Samen (Balint, 1974; Hartley und Lord, 2004a; Youle und Huang, 1976). Dabei handelt es sich um eines der stärksten Toxine biologischer Herkunft. Die mittlere letale Dosis (LD₅₀) liegt bei ca. 3 µg/kg und entspricht bei erwachsenen Menschen dem Verzehr von etwa vier bis acht Samen (Lin *et al.*, 1970; Wedin *et al.*, 1986). Industriell werden die Samen hauptsächlich zur Gewinnung von Rizinusöl verwendet, das aufgrund seiner laxativen Wirkung als starkes Abführmittel im medizinischen Bereich eingesetzt wird (Olsnes, 2004). Auch bei der Herstellung von Farben und Lacken

wird auf das Öl zurückgegriffen (Beyer *et al.*, 2009; Burgsh, 1960). Bereits im 19. Jahrhundert veranlasste die starke toxische Wirkung der Samen Stillmark dazu, die für die Toxizität verantwortliche Komponente näher zu charakterisieren (Stillmark, 1888). Neunzig Jahre später stellte sich heraus, dass es sich bei den von Stillmark isolierten Ricin-Extrakten fälschlicherweise um ein Gemisch aus Ricin und einer nicht-toxischen Komponente, dem *Ricinus communis* Agglutinin, handelte (Olsnes, 1978). Dennoch legten die Entdeckungen von Stillmark den Grundstein für das heutige Wissen über die Funktion, Struktur und Wirkungsweise von Ricin.

1.1.2 Funktion der Untereinheiten

Ricin selbst stellt ein heterodimeres Glykoprotein dar, welches sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammensetzt. Beide Untereinheiten sind kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Hartley und Lord, 2004a; Lord *et al.*, 1994). Die A-Untereinheit (RTA, 32 kDa) repräsentiert dabei die katalytische Domäne, die als N-Glykosidase fungiert und in der Lage ist, einen spezifischen Adenin-Rest an Position 4.324 der ribosomalen 28S rRNA zu entfernen (Endo und Tsurugi, 1987; Endo und Tsurugi, 1988). Der hoch konservierte Adenin-Rest befindet sich in einem Tetraloop (GAGA). Dieser liegt innerhalb eines konservierten Bereichs aus zwölf Ribonukleotiden, der als α -Sarcin/Ricin-Loop (SRL) bezeichnet wird (Szewczak *et al.*, 1993). Durch die Depurinierung bleibt zwar das Phosphodiester-Rückgrat der rRNA intakt (Endo und Tsurugi, 1987), jedoch wird die Bindung der essentiellen Elongationsfaktoren EF-2 und EF-1 irreversibel blockiert (Montanaro *et al.*, 1975; Nilsson und Nygard, 1986). Dadurch werden die Initiation der Proteintranslation sowie die damit verbundene Proteinbiosynthese verhindert (Moazed *et al.*, 1988). Ein einzelnes RTA-Molekül ist dabei in der Lage, *in vitro* ca. 2.000 Ribosomen pro Minute zu inaktivieren (Eiklid *et al.*, 1980; Sandvig und van Deurs, 2002a). Die Inhibierung der Ribosomen führt letztendlich zur Hemmung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod der betroffenen Zellen. Interessanterweise reagieren Ribosomen verschiedener Organismen unterschiedlich auf RTA. Tierische Ribosomen besitzen dabei eine fünffach höhere Sensitivität als pflanzliche Ribosomen (Cawley *et al.*, 1977; Harley und Beevers, 1982; Taylor *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu sind prokaryotische Ribosomen resistent gegenüber RTA (Nilsson und Nygard, 1986). Zusätzlich belegen neueste Untersuchungen an Hefe- und Säugerzellen, dass RTA in der Lage ist, die „unfolded protein response“ (UPR) zu inhibieren, indem einerseits das Spleißen der *HAC1/XBP1*-mRNA verhindert und andererseits die Phosphorylierung von Ire1p blockiert wird (Parikh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

Die B-Untereinheit (RTB, 34 kDa) ist hingegen für die Bindung des Toxins an die Oberfläche von Zielzellen verantwortlich. RTB bindet dabei an komplexe Kohlenhydrat-Strukturen von Glykoproteinen oder -lipiden der Plasmamembran, die terminale N-Acetylglukosamin- bzw. β -1,4-Galaktosereste besitzen (Baenziger und Fiete, 1979; Sandvig *et al.*, 1978). In Abbildung 1 sind der Wirkungsmechanismus sowie der Aufbau von Ricin schematisch zusammengefasst.

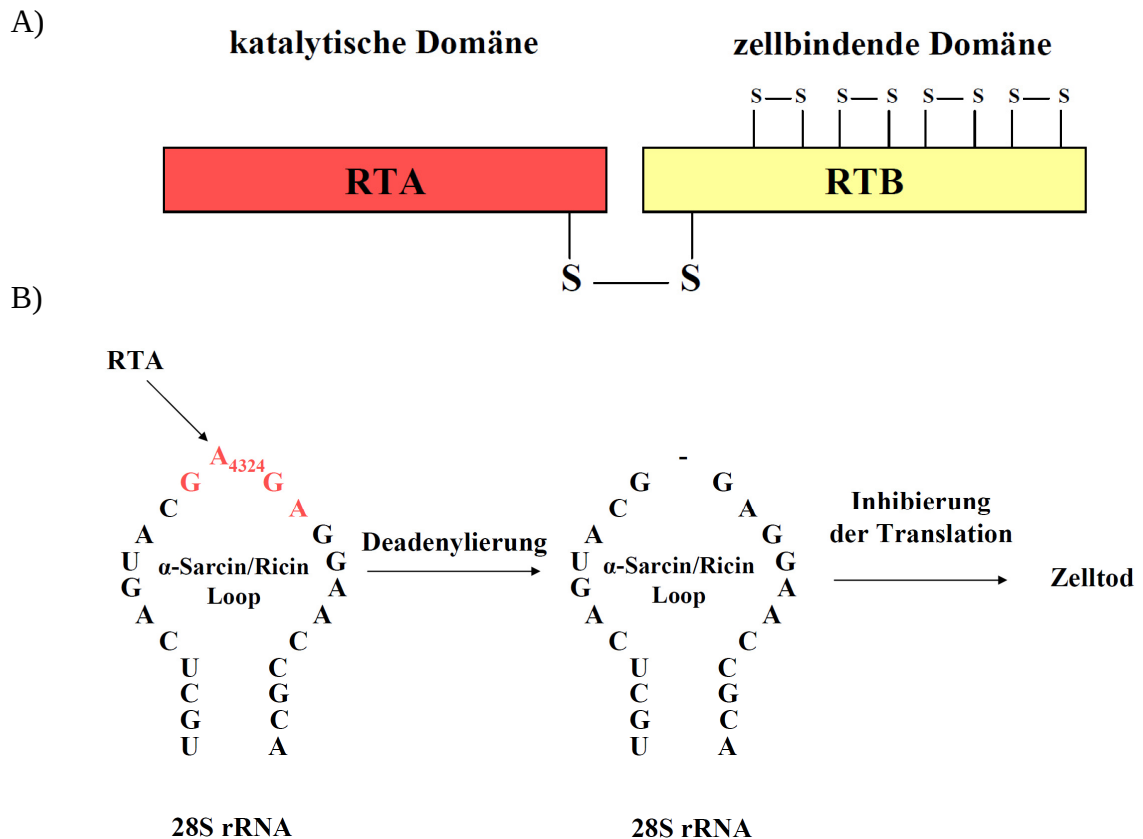


Abbildung 1: (A) Schematische Struktur und (B) Wirkungsmechanismus von Ricin (verändert nach Szewczak *et al.*, 1993).

1.1.3 Dreidimensionale Struktur

Neben der Primärsequenz konnte auch die dreidimensionale Struktur von Ricin und rekombinantem RTA durch Röntgenkristallanalyse aufgeklärt werden (Montfort *et al.*, 1987; Weston *et al.*, 1994). Anhand der Röntgenkristallstruktur von Rutenber und Robertus (1991) können die strukturellen Toxinmerkmale im gefalteten Zustand verdeutlicht werden (Abbildung 2).

Die katalytische A-Untereinheit besteht aus einem β -Faltblatt und acht α -Helices. Diese Sekundärstrukturen machen ca. 50 % der 267 AS langen Untereinheit aus. Strukturell kann

RTA in drei Domänen unterteilt werden. Dabei bilden ca. 40 % des N-Terminus eine kompakte Faltungseinheit, die aus dem β -Faltblatt und zwei α -Helices aufgebaut ist. An diese knüpft die zweite Domäne an, die aus fünf α -Helices besteht und wiederum ca. 40 % von RTA ausmacht. Die zentrale α -Helix der zweiten Domäne ist größtenteils unpolar und beinhaltet zwei der insgesamt acht Reste des aktiven Zentrums (Gly177 und Arg180). Die übrigen 20 % des C-terminalen Bereichs von RTA bilden die dritte Domäne, die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt und für die Interaktion mit RTB entscheidend ist (Katzin *et al.*, 1991; Lord *et al.*, 1994).

Die 262 AS lange B-Untereinheit besteht hingegen aus zwei homologen Domänen, die durch Genduplikation entstanden sind. Jede einzelne Domäne ist wiederum aus einem Linkerpeptid (Lambda) sowie drei homologen Untereinheiten α , β und γ aufgebaut. Diese sind aus einem ursprünglichen Galaktose-Bindemotiv entstanden, wobei nur noch eine Untereinheit pro Domäne eine Galaktose-Bindeaktivität besitzt (Hart, 2010; Lord *et al.*, 1994). Im Vergleich zu anderen zuckerbindenden Proteinen ist die Galaktose-Bindung sehr schwach, weshalb bislang noch kein spezifischer Rezeptor identifiziert werden konnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Ricin auch durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert wird.

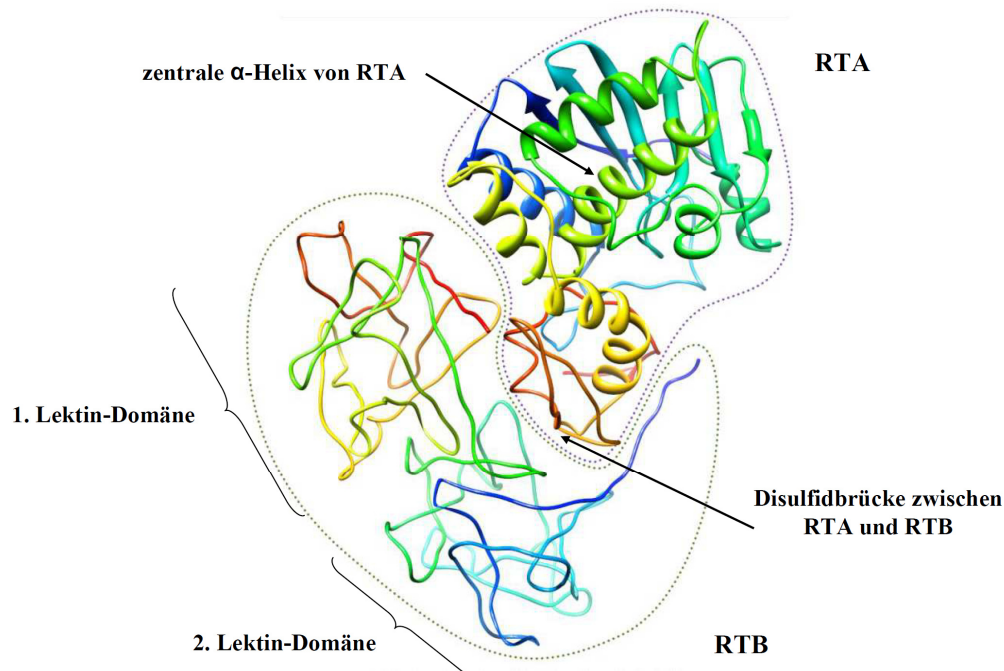


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des Pflanzentoxins Ricin. Schematische Darstellung der von Rutenber und Roberts (1991) beschriebenen Struktur (Auflösung: 2,5 Å). Der C-Terminus von RTA und RTB ist in blau und der N-Terminus in rot dargestellt (verändert nach Hart, 2010).

1.1.4 Klassifizierung von Ricin

Ricin wird aufgrund der zweiteiligen Struktur und der funktionellen Eigenschaften der beiden Untereinheiten zur Klasse der A/B-Toxine gezählt (Falnes und Sandvig, 2000). Die prominentesten humanpathogenen Vertreter dieser Toxinklasse sind z. B. die Anthrax-, Cholera- und Shiga-Toxine sowie verschiedene Neurotoxine wie das Tetanus- oder Botulinum-Toxin (Sandvig und van Deurs, 2002a). Neben Ricin werden auch die pflanzlichen Toxine Abrin und Modeccin dieser Klasse zugeordnet (Falnes und Sandvig, 2000). Im Allgemeinen zeichnen sich A/B-Toxine durch das Vorhandensein einer A- und B-Kette aus. Dabei entfaltet die enzymatisch aktive A-Kette ihre toxische Wirkung im Zytosol der Zielzelle. Die Wirkungsmechanismen reichen dabei von der Hemmung der Translation bis hin zur Blockierung der synaptischen Reizweiterleitung (Sandvig und van Deurs, 2002a). Eine Ausnahme stellt das Subtilase-Zytotoxin dar, welches bereits im ER-Lumen die spezifische Spaltung des Chaperons BiP vermittelt. Die Inaktivierung von BiP stimuliert die Freisetzung von Cytochrom C, wodurch die Zelle die Apoptose einleitet (Matsuura *et al.*, 2009; Paton *et al.*, 2006; Paton und Paton, 2010). Zudem besitzen A/B-Toxine eine aus einer oder mehreren B-Segmenten bestehende B-Kette, die für die Zellbindung verantwortlich ist. Beide Untereinheiten sind wie im Fall von Ricin über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Sandvig *et al.*, 2010b).

Mit Ausnahme von Ricin binden A/B-Toxine vorwiegend an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Falnes und Sandvig, 2000). Die anschließende Internalisierung erfolgt zumeist durch Endozytose (Lord *et al.*, 1994; Rogel und Hanski, 1992). Dabei sind sowohl Clathrin-unabhängige als auch Clathrin-vermittelte Endozytose-Mechanismen beschrieben (Sandvig und van Deurs, 2002a). Auch die Translokation in das Zytosol verläuft auf unterschiedlichen Wegen. Während das Diphtherie- und Anthrax-Toxin beispielsweise direkt aus den Endosom in das Zytosol gelangen, werden die meisten A/B-Toxine, darunter auch Ricin, nach dem Erreichen des endosomalen Kompartiments retrograd über den Golgi-Apparat in das ER transportiert (Collier, 2001; el Baya *et al.*, 1997; Sandvig und van Deurs, 2002b; Spooner *et al.*, 2006; Young und Collier, 2007). Der intrazelluläre Transport von A/B-Toxinen endet im Allgemeinen mit der Translokation in das Zytosol. Dort kommt es durch die verschiedenen Wirkungsmechanismen letztendlich zum Tod der betroffenen Zelle. Allerdings sind die zugrunde liegenden Transportprozesse sowie die darin involvierten Proteine bei vielen A/B-Toxinen nur teilweise beschrieben oder noch vollkommen unbekannt. Des Weiteren gehört Ricin zur großen Klasse der Ribosomen-inaktivierenden Proteine, kurz RIPs (Roberts und Smith, 2004). Die Vertreter dieser Klasse besitzen allesamt eine

N-Glykosidase-Aktivität, wodurch sie in der Lage sind, spezifisch einen oder mehrere Adeninreste der ribosomalen 28S RNA zu entfernen und somit die Ribosomen irreversibel zu schädigen (Stirpe, 2004). Die Einteilung der RIPs erfolgt in der Regel in zwei Hauptklassen: Typ-1 bzw. Typ-2 RIPs (Hartley und Lord, 2004a), wobei Ricin zum Typ-2 gehört. Zusätzlich ist noch die Klasse der Typ-3 RIPs beschrieben, der jedoch nur JIP60 aus *Hordeum vulgare* angehört (Peumans *et al.*, 2001; Reinbothe *et al.*, 1994). Während die Gruppe der Typ-1 RIPs nur aus einer enzymatisch aktiven Polypeptidkette bestehen, sind Typ-2 RIPs aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut. Neben der katalytischen A-Untereinheit besitzen sie eine zusätzliche B-Untereinheit, die für die Zellbindung verantwortlich ist (Barbieri *et al.*, 1982; Olsnes und Pihl, 1973). Die Polypeptidkette des Typ-3 RIPs, JIP60, setzt sich dagegen aus zwei Domänen zusammen; die N-terminale Domäne ähnelt dabei der Typ-1 Polypeptidkette, wohingegen die Funktion der C-terminalen Domäne noch unbekannt ist (Reinbothe *et al.*, 1994). Eine Einteilung der RIPs sowie einige Beispiele sind in Abbildung 3 vergleichend dargestellt.

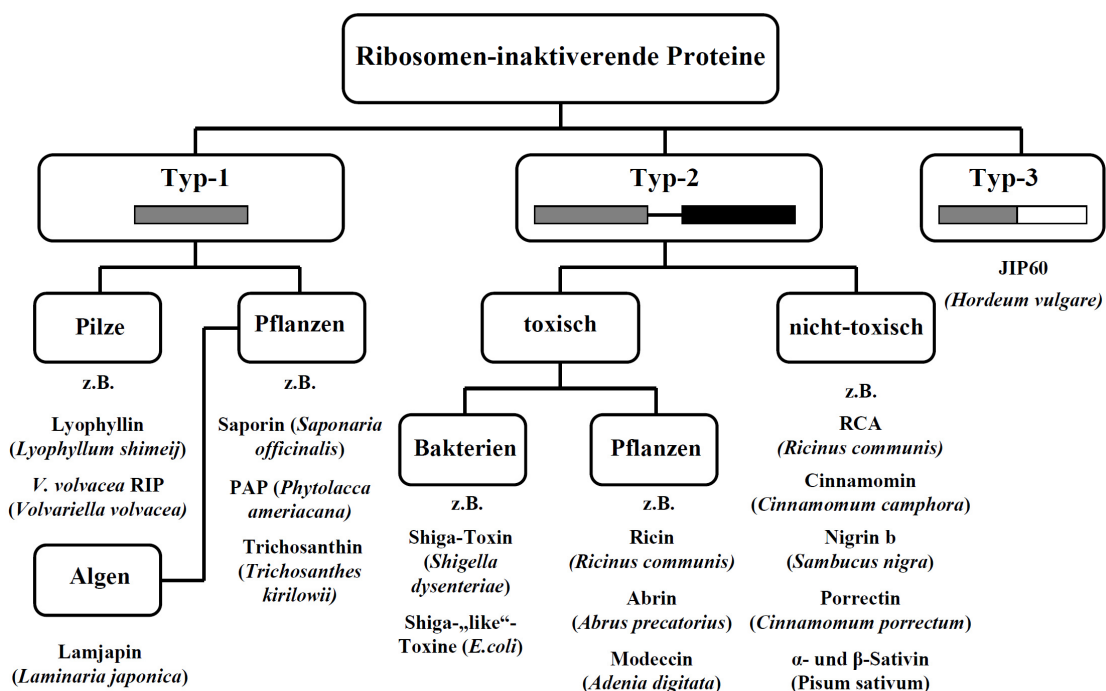


Abbildung 3: Einteilung der Ribosomen-inaktivierenden Proteine in die einzelnen Unterklassen.

In der Abbildung ist die schematische Struktur der verschiedenen Typen angedeutet. (■) stellt dabei die A-Untereinheit (N-Glykosidase-Aktivität), (■) die B-Untereinheit (Zellbindung) und (□) eine Untereinheit mit unbekannter Funktion dar. Die A- und B- Untereinheit sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. In Klammern sind zusätzlich die Produzenten der unterschiedlichen RIPs angegeben.

In der Natur sind RIPs vor allem im Pflanzenreich weit verbreitet. Außerdem kommen sie in einer Reihe von Nutzpflanzen wie z. B. Mais, Kürbis und Spinat vor (Barbieri *et al.*, 2006;

Ishizaki *et al.*, 2002; Prestle *et al.*, 1992; Walsh *et al.*, 1991). Aber auch einige Pilze, Bakterien (z. B. Shiga-Toxin aus *Shigella dysenteriae*) sowie die Alge *Laminaria japonica* sind in der Lage, RIPs zu exprimieren (Girbes *et al.*, 2004; Hartley und Lord, 2004b; Stirpe, 2004). Größtenteils handelt es sich dabei um Typ-1 RIPs, die in einer Vielzahl von Pflanzen in teilweise sehr hohen Konzentrationen (mehrere 100 mg) zu finden sind (Stirpe, 2004). Im Gegensatz zu einigen Typ-2 RIPs sind die meisten Mitglieder vom Typ-1 nicht toxisch und stellen somit keine ernstzunehmende Gefahr für den Menschen dar. Aufgrund der antiviralen Wirkung besteht ihre Aufgabe in Pflanzen wahrscheinlich in der Abwehr von pathogenen Viren (Parikh und Tumer, 2004; Wang und Tumer, 2000). Unter den Typ-2 RIPs sind unterdessen mehrere hochpotente Toxine zu finden. Neben Ricin zählen Volkensin aus *Adenia volkensii* und Abrin aus *Abrus precatorius* zu den stärksten Vertretern (Audi *et al.*, 2005; Barbieri *et al.*, 2004). Allerdings besitzen nicht alle Typ-2 RIPs eine toxische Wirkung, weshalb sie nochmals in nicht-toxische und toxische Vertreter unterteilt werden können (Stirpe, 2004).

1.1.5 Natürliche Ricin-Biosynthese in *Ricinus communis*

In *R. communis* findet die Biosynthese von Ricin während der Samenreifung statt und endet mit der Speicherung von katalytisch aktivem Toxin in den Vakuolen der Endospermzellen reifer Samen (Roberts und Lord, 1981; Youle und Huang, 1976). Neben Ricin sind noch weitere Isoformen (RI, RII, RIII und RCA) beschrieben, die zusammen etwa 5 % der im Samen enthaltenen Proteine ausmachen (Sehgal *et al.*, 2010). Die Ricin-Isoformen RI-RIII unterscheiden sich beispielsweise in ihren Glykosylierungsmustern, wodurch deren toxische Wirkung variieren kann (Sehgal *et al.*, 2011). Die Toxinsynthese beginnt mit der Translation eines 576 AS großen Vorläuferpeptids, das als Präproricin bezeichnet wird (Butterworth und Lord, 1983). Dieses besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (26 AS), gefolgt von einem Propeptid (9 AS) sowie den späteren RTA- (267 AS) und RTB- (262 AS) Untereinheiten. Im Vorläufer sind die beiden Untereinheiten zusätzlich durch ein intramolekulares Linker-Propeptid (12 AS) voneinander getrennt (Ferrini *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 1985).

Während der Proteintranslation vermittelt das Signalpeptid im ersten Transportschritt den cotranslationalen Import in das ER (Ferrini *et al.*, 1995). Im ER-Lumen wird das Signalpeptid abgespalten, wodurch das sogenannte Proricin entsteht. Zusätzlich werden die vier primären Glykosylierungsstellen durch den OST-Komplex glykosyliert (Lord, 1985). Abschließend wird das Proricin durch die Ausbildung von fünf Disulfidbrücken stabilisiert, wobei vier innerhalb von RTB entstehen und die fünfte die späteren RTA und RTB-Untereinheiten

miteinander verbindet (Lord, 1985; Rutenber und Robertus, 1991). Das prozessierte Proricin gelangt im zweiten Transportschritt über den Golgi-Apparat in die Speichervakuolen der Endospermzellen. Dabei erfolgt der Transport in sogenannten „precursor accumulating vesicles“ (PAC) (Hara-Nishimura *et al.*, 1998). In den Vakuolen werden sowohl das N-terminale Propeptid als auch das Linker-Peptid entfernt, so dass das native, heterodimere Toxin entsteht (Butterworth und Lord, 1983). Das abgespaltene Linker-Peptid gewährleistet die korrekte Zielsteuerung von Proricin in die Vakuole, wohingegen die Funktion des N-terminalen Propeptids noch ungeklärt ist (Frigerio *et al.*, 2001).

Die Pflanze selbst minimiert durch die verschiedenen posttranslationalen Modifikationsschritte die Wahrscheinlichkeit, durch das eigene Toxin geschädigt zu werden. Sowohl Präproricin als auch Proricin liegen in einer inaktiven Form vor, wodurch ein unbeabsichtigter Transport in das Zytosol keine direkte Inaktivierung der Ribosomen zur Folge hat (Richardson *et al.*, 1989). Des Weiteren scheint RTB das aktive Zentrum des reifen Toxins sterisch zu blockieren, so dass RTA erst nach Abspaltung der Linkersequenz die N-Glykosidase-Aktivität erlangt (Wright und Robertus, 1987). Auch die Speicherung in einem separaten Kompartiment, den Vakuolen, stellt einen weiteren Schutzmechanismus vor dem eigenen Toxin dar. Sollte dennoch ein aktives RTA-Molekül in das Zytosol gelangen, kommt es aufgrund der beiden Lysinreste zur schnellen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation (Lord *et al.*, 2005). Dies zusammen mit der Tatsache, dass pflanzliche Ribosomen weniger anfällig gegenüber Ricin sind, erlaubt der Pflanze große Mengen an Ricin zu synthetisieren und zum Schutz vor potentiellen Fressfeinden in den Samen zu speichern (Harley und Beevers, 1982; Lord *et al.*, 2005).

1.1.6 Anwendungsmöglichkeiten von Ricin

Unabhängig von seiner physiologischen Rolle in Pflanzen wird Ricin sowohl in der Biomedizin als auch in der Forschung in unterschiedlichsten Bereichen eingesetzt. Beispielsweise wird bei der Behandlung von Krankheiten wie z. B. in der Krebstherapie versucht, Ricin an unterschiedliche Antikörper zu koppeln oder an spezifische Liganden, deren Rezeptoren auf Tumorzellen stark überexprimiert werden, zu fusionieren (Barth *et al.*, 2000; Burbage *et al.*, 1997; Frankel *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 2001). Dadurch soll die katalytische Untereinheit gezielt zu den entarteten Tumorzellen dirigiert und diese nach erfolgter Internalisierung abgetötet werden. Obwohl sogenannte chimäre Toxine ein großes Potential in der Bekämpfung von Krankheiten besitzen, wurde bis heute lediglich ein einziges als Medikament zugelassen. Bei Denileukin diftotox handelt es sich um ein

Fusionsprotein aus der zytotoxischen Untereinheit des Diphtherie-Toxins und Interleukin-2, welches zur Behandlung von malignen T-Zell-Lymphomen eingesetzt wird (Turturro, 2007). Das Hauptproblem der Immunotoxine stellt in der Regel die geringe Spezifität dar, wodurch auch gesunde Zellen geschädigt werden und es zu starken Nebenwirkungen wie z. B. dem Kapillarlecksyndrom (VLS) sowie Leber- und Nierenschäden kommen kann (Baluna *et al.*, 2000; Baluna und Vitetta, 1997; Frankel *et al.*, 1995). Zukünftig sollen die Nebeneffekte durch die Verwendung von bispezifischen Antikörpern sowie modifizierten Toxinvarianten soweit minimiert werden, dass eine effektivere und schonendere Behandlung der Patienten erfolgen kann (Sandvig *et al.*, 2010b; Smallshaw *et al.*, 2003; Vallera *et al.*, 2009).

Eventuell kann auch die Diagnose von bestimmten Krebsarten wie z. B. Darmkrebs in Zukunft mit Hilfe von A/B-Toxinen erfolgen. Zum Beispiel sind auf der Oberfläche vieler Tumorarten die potentiellen Shiga-Toxin-Rezeptoren stark überexprimiert, wodurch eine Früherkennung der Tumore durch die zellbindende B-Untereinheit des Shiga-Toxins zukünftig möglich sein könnte (Johannes und Römer, 2010).

Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Entwicklungsbiologie dar (Lord *et al.*, 1994). RTA kann dort zur spezifischen Abtötung von Geweben oder Zelltypen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien eingesetzt werden. Die anschließenden Auswirkungen auf die Entwicklung eines Organismus kann somit genau analysiert werden. Beispielsweise konnte mit Hilfe transgener Mäuse, die RTA unter der Kontrolle des α -A Kristallin Promotors exprimierten, die Entwicklung der Augenlinse näher untersucht werden (Landel *et al.*, 1988). Auch in *Drosophila melanogaster* können durch die gezielte Abtötung von Zellen mittels RTA grundlegende Entwicklungsvorgänge genau charakterisiert werden (Chen *et al.*, 2012; Moffat *et al.*, 1992; O'Kane und Moffat, 1992).

Zusätzlich stellen A/B-Toxine wie Ricin auch ein wichtiges Instrument zur Charakterisierung grundlegender zellulärer Transportprozesse, wie z. B. der Endozytose und Retrotranslokation, in Säugerzellen dar (Schiavo und van der Goot, 2001). Auf diese Art und Weise kann beispielsweise auch der retrograde Transport in Säugerzellen genauer verstanden werden. Mit Hilfe des Shiga-Toxins konnte beispielsweise 1992 erstmals der retrograde Weg von der Plasmamembran bis in das ER beschrieben werden (Sandvig *et al.*, 1992). Mittlerweile werden A/B-Toxine jedoch nicht nur zur Untersuchung von Transportwegen eingesetzt, sondern auch als Carrier-Systeme zum Import von Proteinen bzw. DNA in Zielzellen genutzt (Fominaya und Wels, 1996; Viel *et al.*, 2008).

Neben den vielfältigen biomedizinischen Anwendungsmöglichkeiten kann Ricin allerdings auch als biologische Waffe zweckentfremdet werden (Henghold, 2004; Musshoff und Madea,

2009). Trotz intensiver Forschung konnte noch kein effektives Gegenmittel für den Menschen entwickelt werden (Audi *et al.*, 2005). Jedoch ist die Neutralisation von Ricin durch entsprechende Antikörper bereits mehrfach *in vitro* gelungen und auch teilweise im Mausmodell gezeigt worden (Beyer *et al.*, 2009; Dertzbaugh *et al.*, 2005; Lemley *et al.*, 1994; Mantis *et al.*, 2006; Prigent *et al.*, 2011). Auch zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Ricin wurden eine Vielzahl verschiedenster Ansätze getestet, wobei nur zwei sehr vielversprechende Resultate in klinischen Studien am Menschen lieferten (Legler *et al.*, 2011; Smallshaw *et al.*, 2007; Smallshaw und Vitetta, 2012). Um die Entwicklung neuartiger Antikörper weiter voranzutreiben bzw. vorhandene zu verbessern, ist vor allem ein detailliertes Wissen über die Toxinstruktur und -wirkung von essentieller Bedeutung.

Insgesamt stellt Ricin besonders wegen der eben genannten Gründe und seines enormen Potentials in ähnlichen Fragestellungen noch heute ein wichtiges Forschungsgebiet dar und wird auch mittel- und langfristig von großem wissenschaftlichem Interesse sein. Um sich allerdings das Potential von Ricin und anderen A/B-Toxinen in der Bekämpfung von Krankheiten zu Nutze zu machen, ist es unbedingt notwendig, deren Intoxifikationsmechanismen zu verstehen.

1.1.7 Intoxifikation von Säugerzellen

In den letzten Jahrzehnten wurden die komplexen Transportwege von Ricin intensiv untersucht, um die zugrunde liegenden Mechanismen im Detail zu charakterisieren und aufzuklären. Das Pflanzentoxin Ricin gelangt über einen mehrstufigen Transportmechanismus zu seinem Wirkungsort, dem Zytosol. Zuerst bindet das Toxin an die Zelloberfläche der Zielzelle und wird durch Rezeptor-unabhängige Endozytose internalisiert. Danach wird das Toxin retrograd von frühen endosomalen Kompartimenten über das TGN zum ER transportiert. Anschließend erfolgt von dort die Retrotranslokation von RTA durch die ER-Membran in das Zytosol. Im letzten Schritt inaktiviert RTA die eukaryotischen Ribosomen, was den Tod der Zielzelle zur Folge hat (Lord *et al.*, 1994; Rapak *et al.*, 1997; Sandvig *et al.*, 2010b).

1.1.7.1 Bindung, Endozytose und retrograder Transport zum Golgi-Apparat

Im ersten Intoxifikationsschritt bindet RTB mit Hilfe seiner beiden Galaktose-Bindestellen an terminale Galaktosereste von Glykolipiden bzw. -proteinen der Zelloberfläche von Säugerzellen. Da die Plasmamembran von BHK-21-Zellen beispielsweise durchschnittlich ca. $1,25 \times 10^7$ potentielle Galaktose-Bindungsstellen für Ricin besitzt, werden Toxinmoleküle

von der Plasmamembran weitestgehend absorbiert (Van Deurs *et al.*, 1988). Zusätzlich zeigen Untersuchungen an Leberendothelzellen sowie Makrophagen, dass Ricin auch an andere Strukturen wie z. B. bestimmte Mannose-Rezeptoren auf deren Zelloberfläche binden kann (Simmons und Russell, 1985; Simmons *et al.*, 1986). Die anschließende Aufnahme des Toxins kann sowohl über Clathrin-vermittelte als auch Clathrin-unabhängige Endozytose erfolgen (Sandvig und van Deurs, 1996; Simpson *et al.*, 1998). Zusätzlich kann die Internalisierung von Ricin sowohl Dynamin-unabhängig als auch -vermittelt ablaufen, wobei die genauen Mechanismen unbekannt sind (Llorente *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1998).

Ein Großteil der endozytierten Toxinmoleküle wird entweder in den Lysosomen degradiert oder zurück zur Plasmamembran befördert und exozytiert (Moisenovich *et al.*, 2004; Sandvig und van Deurs, 1996; Van Deurs *et al.*, 1986). Nur ca. 5 % des Toxins werden retrograd zum TGN transportiert (Van Deurs *et al.*, 1988). Der Transport verläuft dabei Rab9- und Rab11-unabhängig und scheint vermutlich aus den frühen endosomalen Kompartimenten zu erfolgen (Iversen *et al.*, 2001; Lauvrak *et al.*, 2002). Auch die Beteiligung der GTPasen, Rab6 und Rab6a, die den Transport vom frühen Endosom zum TGN regulieren, unterstützt diese Annahme (Moreau *et al.*, 2011; Utskarpen *et al.*, 2006). Der retrograde Transport von Ricin durch den Golgi-Apparat ist dabei entscheidend für dessen toxische Wirkung, da eine Zerstörung des Kompartiments durch Brefeldin A zur Toxinresistenz von Säugerzellen führt (Yoshida *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu führt die Erhöhung des Toxintransports zum Golgi-Apparat mittels Monensin zu einer gesteigerten *in vivo* Toxizität (Morre *et al.*, 1987; Vasandani *et al.*, 1992). Außerdem kann die toxische Wirkung von Ricin durch das Anfügen des Golgi-Retentionssignals YQRL verstärkt werden (Zhan *et al.*, 1998).

Mittlerweile ist bekannt, dass sowohl der GARP-Komplex als auch die Proteine VAMP4, Syntaxin 5/6/16 eine wichtige Rolle beim Eintritt in den Golgi-Apparat übernehmen, wohingegen der Retromer-Komplex keine Rolle spielt (Moreau *et al.*, 2011; Stechmann *et al.*, 2010). Die Inhibierung von Syntaxin 5 beispielsweise schützt Mäuse vor einer letalen Ricin-Dosis. Dabei verhindert der Inhibitor Retro-2 die Fusion von Syntaxin 5-positiven Vesikeln mit dem TGN, wobei der Mechanismus noch unbekannt ist (Stechmann *et al.*, 2010). Auch eine Beteiligung des TRAPP- und COG-Komplexes am Ricin-Transport konnte beobachtet werden (Moreau *et al.*, 2011). Neben den unterschiedlichen Transportkomplexen spielt auch die Zusammensetzung der Membranen eine entscheidende Rolle. Säugerzellen, die einen reduzierten Cholesterolgehalt besitzen, zeigen einen verringerten Toxintransport vom Endosom zum TGN, während der Verlust von Sphingolipiden eine gesteigerte *in vivo* Toxizität zur Folge hat (Grimmer *et al.*, 2000; Grimmer *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2011).

1.1.7.2 Retrograder Transport zum ER

Nachdem das Toxin retrograd durch den Golgi-Apparat transportiert wurde, gelangt ein Bruchteil der Toxinmoleküle zum ER, wobei der genau Mechanismus ebenfalls noch unklar ist. Allerdings konnte direkt und indirekt gezeigt werden, dass Ricin in das ER-Lumen transportiert wird (Rapak *et al.*, 1997; Sandvig und van Deurs, 2002b; Slominska-Wojewodzka *et al.*, 2006). Natürlicherweise besitzt Ricin keines der bekannten ER-Retentionssignale, die den klassischen retrograden Transport über COPI-Vesikel zum ER vermitteln (Cosson *et al.*, 1998; Sandvig *et al.*, 2010b). Durch das Anfügen eines zusätzlichen ER-Retentionssignals (KDEL) kann jedoch die *in vivo* Toxizität von Ricin gesteigert werden (Wales *et al.*, 1992; Zhan *et al.*, 1998). Andere A/B-Toxine wie z. B. das *Pseudomonas* Exotoxin A oder das Cholera-Toxin hingegen verfügen über ein entsprechendes ER-Retentionssignal, mit dessen Hilfe sie zum ER transportiert werden (Kreitman und Pastan, 1995; Majoul *et al.*, 1998; Majoul *et al.*, 1996). Interessanterweise behält auch das Cholera-Toxin nach Entfernung des natürlichen KDEL-Signals seine toxische Wirkung, weshalb der retrograde Toxintransport in das Zytosol auch über alternative Routen ablaufen kann (Lencer *et al.*, 1995). Auch im Falle von Ricin ist die katalytische A-Kette in der Lage, ohne die zellbindende B-Kette in das Zytosol von Säugerzellen zu gelangen. Dabei erfolgt die Inhibierung der Proteinbiosynthese aber erst bei höheren RTA-Dosen. Dieser Effekt kann allerdings durch das Anfügen eines KDEL-Retentionssignals verstärkt werden (Wales *et al.*, 1993; Wesche *et al.*, 1999).

Trotz intensiver Forschung konnte der Transportmechanismus, der den Golgi-ER-Transport von Ricin vermittelt, noch nicht identifiziert werden. Eventuell bindet Ricin an andere KDEL-tragende Proteine im Golgi und wird somit retrograd zum ER befördert. *In vitro* konnte eine Interaktion zwischen Ricin und dem KDEL-tragenden Chaperon Calretikulin bereits beobachtet werden (Day *et al.*, 2001). Dennoch scheint dies nicht den Haupttransportweg von Ricin darzustellen, da nach Inhibierung des COPI-Transports keine Veränderung der toxischen Wirkung zu erkennen ist (Chen *et al.*, 2003). Ein COPI-unabhängiger Transport zum ER wurde zudem bei anderen A/B-Toxinen wie z. B. dem Shiga-Toxin identifiziert und scheint auch im Fall von Ricin zuzutreffen (Girod *et al.*, 1999). In Ausnahmefällen kann Ricin auch ohne die Beteiligung des Golgi-Apparates direkt vom Endosom zum ER transportiert werden, was jedoch nicht der natürlichen Transportroute entspricht (Llorente *et al.*, 2003). Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Golgi-ER-Transport durch ERGIC2 vermittelt wird. Moreau *et al.* (2011) konnten in einer Reihe von Experimenten zeigen, dass ein Knockdown von ERGIC2 das Überleben der Zellen bei

sehr hohen Ricin-Dosen sichert. Zusätzlich war eine Akkumulation fluoreszenzmarkierter Toxinmoleküle im Golgi-Apparat zu beobachten, ohne dass die allgemeine Proteinsekretion gestört war.

Auch bei diesem Transportschritt beeinflusst die Lipidzusammensetzung der Membranen den Transport von Ricin entscheidend. Die Inhibierung der zytosolischen Phospholipase A2 (PLA2), die die Hydrolyse von Glyzerophospholipiden zu Lysophospholipiden katalysiert, führt zu einer signifikanten Verringerung des Toxintransports vom *trans*- zum *cis*-Golgi, wodurch das Toxin vermutlich nicht mehr das ER erreichen kann (Klokk *et al.*, 2011). Obwohl noch viele Aspekte des retrograden Transports unklar sind, kann Ricin wohl über mehrere alternative Transportrouten aus dem Golgi-Apparat retrograd in das ER-Lumen transportiert werden (Rapak *et al.*, 1997; Sandvig *et al.*, 2004).

1.1.7.3 ER-Zytosol-Retrotranslokation

Um die Ribosomen im Zytosol zu erreichen, muss das Toxin mit Hilfe einer der im ER vorliegenden Transportmaschinerien durch die Membran retrotransloziert werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch nicht zweifelsfrei geklärt werden, welcher Kanal den Toxinexport vermittelt. Die Beteiligung der sogenannten TAP-Komplexe („abundant peptide transporter“) kann jedoch ausgeschlossen werden, da in Zellen, denen dieser Komplex fehlt, keine veränderte Sensitivität gegenüber Ricin zu beobachten ist (Roberts und Smith, 2004; Smith *et al.*, 2002). Die ER-Zytosol-Retrotranslokation von einigen anderen A/B-Toxinen wie z. B. dem *Pseudomonas* Exotoxin A (Moreau *et al.*, 2011), Cholera-Toxin (Schmitz *et al.*, 2000) und K28-Toxin (Eisfeld *et al.*, 2000) wird mit dem Sec61-Komplex in Verbindung gebracht. Im Säuger besteht das Sec61-Translokon aus einem trimeren Komplex, der aus den Transmembranproteinen Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ aufgebaut ist (Gorlich und Rapoport, 1993; Hartmann *et al.*, 1994). Im Allgemeinen ist der Komplex für den Import von Proteinen in das ER zuständig, spielt aber wahrscheinlich auch eine Rolle beim Export fehlgefalteter Proteine (Römisch, 1999). Auch im Fall von Ricin konnte eine direkte Interaktion von RTA und Sec61 α *in vivo* beobachtet werden (Wesche *et al.*, 1999). Interessanterweise zeigte der siRNA Knockdown einzelner Komponenten des Sec61-Komplexes jedoch keine sichtbaren Auswirkungen auf den Ricin-Transport, weshalb unklar ist, ob und inwieweit der Sec61-Komplex tatsächlich an der Retrotranslokation von RTA beteiligt ist (Moreau *et al.*, 2011).

Die Vermutung, dass sich einige A/B-Toxine als fehlgefaltetes ERAD-Substrat maskieren und somit in das Zytosol dislozieren, scheint auch für Ricin zuzutreffen (Hazes und Read, 1997). Der als „ER-assoziierte Proteindegradation“ (ERAD) bezeichnete Prozess dient

normalerweise dazu, fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen zu erkennen und in das Zytosol zu exportieren (Tsai *et al.*, 2002). Dort werden diese dann der Degradation durch das 26S Proteasom zugeführt (Hampton, 2002; Jarosch *et al.*, 2003). Einerseits interagiert RTA mit EDEM-1, dessen Beteiligung am säugerspezifischen ERAD bereits beschrieben ist (Slominska-Wojewodzka *et al.*, 2006; Sokolowska *et al.*, 2011). EDEM-1 ist dabei in der Lage, fehlgefaltete Proteine zu erkennen und diese auf direktem Wege dem ERAD zuzuführen (Molinari *et al.*, 2003). Des Weiteren sind CHO-Zellen, die einen genetischen Defekt in der ER-assoziierten Degradation besitzen, resistent gegenüber Ricin (Teter und Holmes, 2002). Außerdem konnten in der Hefe *S. cerevisiae* eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die beim Transport von RTA bzw. mutiertem RTA vom ER in das Zytosol beteiligt sind. Nach Deletion wichtiger hefeeigener ERAD-Komponenten, wie z. B. Hrd1p, Der1p und Hrd3p, war sowohl ein Verlust der Toxizität als auch ein verringerter Toxinabbau durch das Proteasom zu verzeichnen (Li *et al.*, 2011a). Parallel hierzu konnte auch im Säuger die Beteiligung von Derlin1, Derlin 2 und Derlin 3 gezeigt werden (Moreau *et al.*, 2011). Zusätzlich sind auch UFD1L (Ufd1p) und NPLOC4 (Npl4p) in den Transport von Ricin im Säuger involviert, was wiederum auf den ERAD-Pathway hindeutet. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine zusammen mit p97/VCP (Cdc48p) einen Komplex bilden, der mit Derlin 1 interagiert und an der Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER beteiligt ist (Oda *et al.*, 2006). Interessanterweise entsteht dadurch eine Verbindung zu EDEM-1 und p97/VCP, da Derlin 2 und Derlin 3 mit diesen Proteinen assoziiert sind (Hoseki *et al.*, 2010; Oda *et al.*, 2006). Auch das am ERAD beteiligte Protein, Sel1L, ist in den Transport von Ricin involviert (Hoseki *et al.*, 2010; Redmann *et al.*, 2011).

Obwohl der genaue Mechanismus der Translokation noch unklar ist, ist dennoch bekannt, dass die Disulfidbrücke zwischen RTA und RTB vor der eigentlichen Retrotranslokation im ER-Lumen durch die Proteindisulfid-Isomerase (PDI) gespalten wird, da RTA nur im ungefalteten Zustand durch die Membran dislozieren kann (Frigerio *et al.*, 1998; Lord *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich freies RTA in die ER-Membran einlagern kann, wodurch möglicherweise dessen Erkennung als fehlgefaltetes ERAD-Substrat ausgelöst wird (Mayerhofer *et al.*, 2009). Nach dem Passieren der ER-Membran kann sich RTA vermutlich aufgrund des geringen Lysingehalts der Ubiquitin-vermittelten Degradation durch das 26S Proteasom entziehen. Die gesteigerte Toxizität von Ricin nach Inhibierung des Proteasoms sowie die Verringerung der Toxizität nach Einführung zusätzlicher Lysinreste in RTA bestätigen diesen Verdacht (Deeks *et al.*, 2002; Wesche *et al.*, 1999). Im Zytosol wird RTA durch zytosolische Chaperone wie z. B. Hsp70 erkannt, die

dessen Rückfaltung in den nativen Zustand begünstigen (Spooner *et al.*, 2008). Ebenso interagieren UFD1L, NPLOC4 und p97/VCP mit dem Chaperon Hsp70, wodurch sich der Kreis, beginnend mit der Erkennung von RTA durch EDEM-1, schließt (Moreau *et al.*, 2011). Im gefalteten Zustand ist RTA vor dem proteolytischen Abbau geschützt und hat ausreichend Zeit, die Ribosomen zu inaktivieren, was letztendlich zum Zelltod führt (Argent *et al.*, 2000). Eine schematische Übersicht über die Intoxifikationsroute von Ricin ist in Abbildung 4 dargestellt.

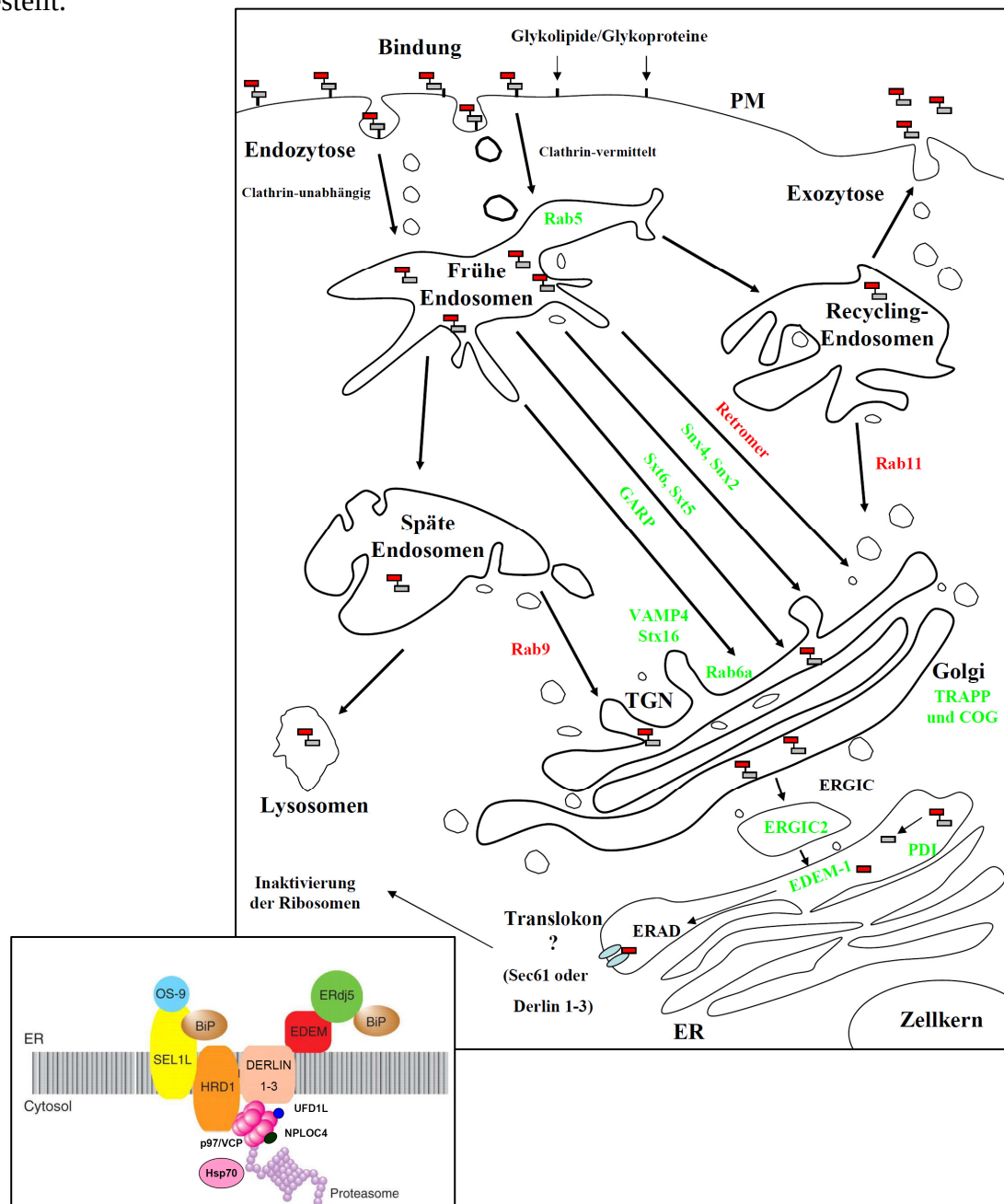


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Intoxifikationsroute von Ricin in Säugerzellen (verändert nach Hoseki *et al.*, 2010; Johannes und Popoff, 2008). Die in grün dargestellten Proteine bzw. Komplexe sind in den Ricin-Transport involviert, wohingegen die rot-markierten nicht beteiligt sind. Das für die Retrotranslokation verantwortliche Translokon ist noch unbekannt. (PM = Plasmamembran; TGN = Trans-Golgi-Netzwerk; ER = Endoplasmatisches Retikulum; ERAD = ER-assoziierte Proteindegradation). (Lizenznummer: 2885350928727)

1.2 *S. cerevisiae* als Modell für den Toxintransport

Aufgrund der kostenintensiven und begrenzten genetischen Manipulierbarkeit von humanen Zellen, werden in der Forschung zunehmend Modellorganismen eingesetzt, um verschiedene Krankheiten, biologische Prozesse sowie die Wirkungsweise von Toxinen auf molekularer Ebene zu charakterisieren (Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Marsh und May, 2012; Rabin und Hauser, 2003; Rea *et al.*, 2010). Die Hefe *S. cerevisiae* stellt dabei einen wichtigen Modellorganismus dar. Im Vergleich zu höheren Eukaryoten sind vor allem die kostengünstige Kultivierung sowie die einfache genetische Manipulierbarkeit der Hefe von Vorteil. Dadurch können Deletionen nicht-essentieller und essentieller Gene durchgeführt und deren Auswirkungen im Anschluss analysiert werden (Rothstein, 1983). Aufgrund der starken Homologien zwischen dem Hefegenom und dem höherer Eukaryoten können die gewonnenen Beobachtungen häufig auch auf höhere Organismen übertragen werden (Botstein *et al.*, 1997). Der Modellorganismus *S. cerevisiae* hat bereits zur Aufklärung wichtiger zellulärer Prozesse, wie z. B. Zellzyklus und Endozytose, entscheidend beigetragen (Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Hartwell, 1974). Außerdem sind Hefemodelle zur Untersuchung von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson gut geeignet (Caine *et al.*, 2007; Zabrocki *et al.*, 2008).

Auch zur Analyse des Transports von Ricin wird ein artifizielles Testsystem in *S. cerevisiae* eingesetzt, um die ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA detailliert analysieren zu können (Li *et al.*, 2011a; Simpson *et al.*, 1999). Dabei wird RTA mit Hilfe eines N-terminalen ER-Importsignals in das ER-Lumen dirigiert, wodurch eine *in vivo* Toxizität in Hefen hervorgerufen wird. Unter diesen Bedingungen wird RTA nicht sekretiert, sondern durch den hefeeigenen ERAD-Pathway erkannt und vermutlich über das Sec61p-Translokon aus dem ER in das Zytosol disloziert (Li *et al.*, 2011a; Lord *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 1999). Durch den geringen Lysin-Gehalt entzieht sich RTA der proteasomalen Degradation und kann die sensitiven Ribosomen inhibieren (Bradley *et al.*, 1987; Deeks *et al.*, 2002). Da das Sec61p-Translokon sowie der ERAD-Pathway dem von Säugerzellen funktionell homolog sind, stellt die Hefe ein vielversprechendes alternatives Testsystem dar. Allerdings ist die Analyse des retrograden Toxintransports von den endosomalen Kompartimenten über das TGN bis zum ER derzeit in Hefen nicht möglich, da die zur Bindung von RTB benötigten galaktosehaltigen Oberflächenstrukturen bei Hefen fehlen. Deshalb zeigt die externe Zugabe von Ricin bzw. RTA auch keinen Einfluss auf die Zellvitalität von Hefen (Becker und Schmitt, 2011; Lord *et al.*, 1994). Um die bestehenden Limitierungen zu beseitigen, ist die Entwicklung innovativer Testsysteme zur Untersuchung des retrograden Transports von Ricin

bzw. RTA in Hefen von großem Interesse. Die dabei gewonnenen Beobachtungen könnten aufgrund der homologen Transportmechanismen auf den Säuger übertragen werden.

1.3 Retrograder Transport in eukaryotischen Zellen

Das sekretorische System eukaryotischer Zellen besteht aus einer Vielzahl von membranumschlossenen Kompartimenten, zu denen das ER, der Golgi-Apparat sowie die Plasmamembran gehören (Bonifacino und Glick, 2004). Dieses Kompartimentsystem steht in enger Verbindung mit dem sogenannten endosomal-lysosomal System, das wiederum aus mehreren membranumschlossenen Kompartimenten, wie z. B. den frühen und späten Endosomen, Lysosomen sowie Lysosom-ähnlichen Organellen (z. B. Melanosomen), zusammengesetzt ist (Bonifacino und Rojas, 2006). Innerhalb der Kompartimente findet ein stetiger vorwärtsgerichteter, anterograder Transport statt. Dieser umfasst neben dem Transport von Lipiden vor allem den Transport von neu synthetisierten Proteinen, die für die Sekretion in den extrazellulären Raum sowie den Verbleib in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen bzw. endosomal-lysosomal Systems bestimmt sind. Beginnend im ER werden die neusynthetisierten Proteine in COPII-Vesikel verpackt und anterograd zum Golgi-Apparat transportiert (Duden, 2003; Zanetti *et al.*, 2011). Dort werden die Proteine sortiert und modifiziert, bevor sie in ihre Zielkompartimente weitertransportiert oder sekretiert werden (Griffiths und Simons, 1986; Halban und Irminger, 1994).

Neben dem anterograden Transport findet in eukaryotischen Zellen auch ein rückwärtsgerichteter, retrograder Transport von Proteinen statt (Johannes und Popoff, 2008). Unter diesem Begriff werden alle Transportmechanismen zusammengefasst, die am Transport von den verschiedenen endosomal Kompartimenten zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bzw. vom *cis*-Golgi zum ER beteiligt sind (Bonifacino und Rojas, 2006; Johannes und Popoff, 2008). Dabei werden zumeist Proteine aber auch Lipide von den endosomal Kompartimenten über eine Reihe unterschiedlicher Transportwege zu den Zielkompartimenten transportiert. Im Gegensatz zum anterograden Transport erfolgt der retrograde Transport vom Golgi zum ER in COPI-Vesikeln (Duden, 2003). Interessanterweise nutzen auch viele bakterielle und pflanzliche Toxine wie z. B. Shiga-Toxin, Cholera-Toxin und Ricin die retrograden Transportwege aus, um über den Golgi-Apparat und das ER in das Zytosol der Zielzelle zu gelangen (Sandvig *et al.*, 2004). Durch Untersuchung des intrazellulären Transports verschiedener Toxine konnten zelluläre Faktoren sowie erste Modelle für den retrograden Transport identifiziert und beschrieben werden (Lencer, 2004;

Lencer *et al.*, 1995; Sandvig *et al.*, 1992). Eine Übersicht der wichtigsten, retrograden und anterograden Transportwege eukaryotischer Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt.

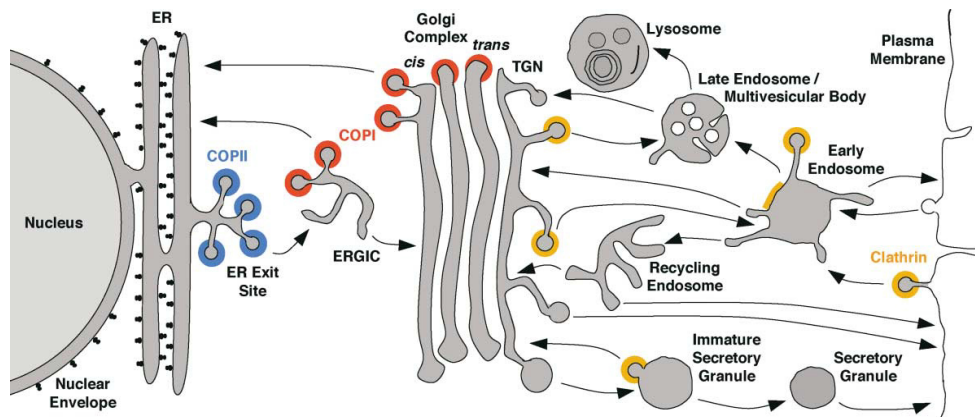


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die intrazellulären Transportwege eukaryotischer Zellen (Bonifacino und Glick, 2004). Die einzelnen Transportwege und deren Richtung (anterograd bzw. retrograd) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Farben stellen die bekannte und wahrscheinliche Lokalisation von COP-II (blau), COP-I (rot) und Clathrin (gelb) dar. (Lizenznummer: 2885350404637)

Sowohl der anterograde als auch der retrograde Transport sind streng reguliert und verlaufen sehr selektiv, wodurch die Zusammensetzung und die Funktion der einzelnen Zellorganellen aufrechterhalten wird (Bonifacino und Rojas, 2006). Grundsätzlich unterscheidet sich der retrograde Transport nicht von anderen, bekannten Vesikel-involvierten Transportmechanismen. Es kommt ebenfalls zur Bildung und Abschnürung membranumschlossener Vesikel, die anschließend mit dem Zielkompartiment fusionieren (Bonifacino und Glick, 2004; Johannes und Popoff, 2008). Lediglich die für diese Prozesse (Rekrutierung, Abschnürung, Andockung und Fusion) verantwortlichen Komponenten unterscheiden sich bei den einzelnen parallel ablaufenden Transportwegen (Abbildung 6). Der retrograde Transport vom Endosom zum TGN startet generell in sogenannten „coated endosomes“, die eine Zwischenstufe zwischen frühen und späten Endosomen darstellen (Raposo *et al.*, 2001). Dabei steht das „coated endosome“ in Verbindung mit dem tubulären endosomalen Netzwerk (TEN). Die Frachtproteine können entweder direkt vom TEN in das TGN befördert werden (z. B.: Vps10p und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) oder sie verbleiben im „coated endosome“, bis dessen Reifung zum späten Endosom abgeschlossen ist (Arighi *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2000; Seaman, 2005; Voos und Stevens, 1998). Im Säuger können die Proteine von dort durch den Rab9-vermittelten Vesikeltransport zum TGN transportiert werden, wobei in Hefen kein homologer Mechanismus beschrieben ist und der

retrograde Transport zum TGN nur aus frühen Endosomen erfolgen kann (Barbero *et al.*, 2002).

Eine entscheidende Komponente des retrograden Endosom-Golgi-Transports stellt das Retromer dar. In *S. cerevisiae* ist der Retromer-Komplex aus fünf Untereinheiten aufgebaut (Vps5p, Vps17p, Vps26p, Vps29p und Vps35p), der sowohl die korrekte Selektion als auch die Abschnürung der Transportvesikel vom frühen Endosom zum TGN reguliert (Seaman *et al.*, 1998). Mit Ausnahme des hefespezifischen Vps17p sind die anderen Komponenten in Eukaryoten hoch konserviert (Bonifacino und Rojas, 2006). Des Weiteren existieren unterschiedliche Sorting-Nexine wie Snx4p, Snx41p und Snx42p, die auch an der Sortierung von Proteinen (z. B. Snc1p) zwischen Endosom und TGN beteiligt sind (Hettema *et al.*, 2003). Auch das Shiga-Toxin nutzt den Retromer-Komplex, um in den Golgi zu gelangen, während Ricin vermutlich Retromer-unabhängig zum TGN transportiert wird (Johannes und Römer, 2010; Moreau *et al.*, 2011).

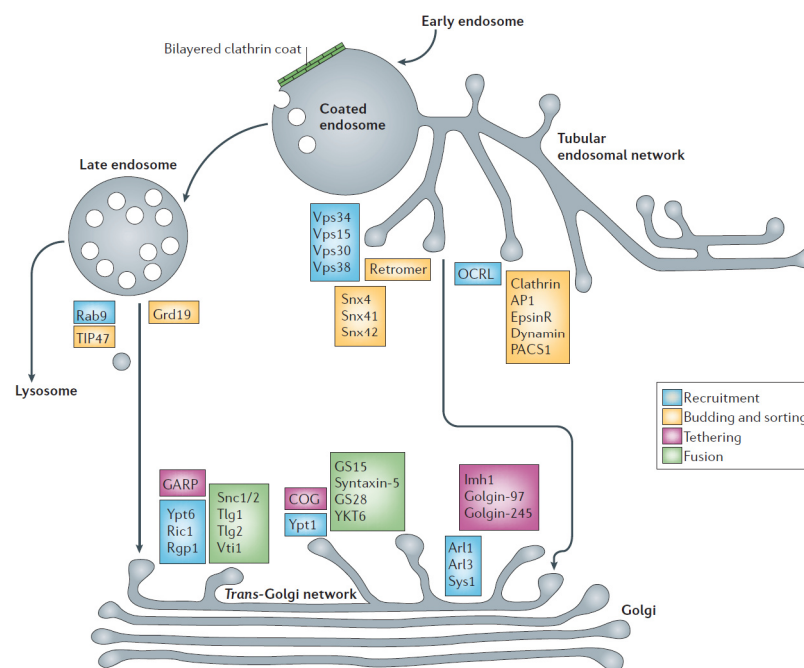


Abbildung 6: Übersicht über die am retrograden Transport vom Endosom zum TGN beteiligten Komponenten (verändert nach Bonifacino und Rojas, 2006). Es sind sowohl hefe- als auch säugerspezifische Transportkomponenten dargestellt. Alle Komponenten sind farblich nach ihren Funktionen in Membranrekrutierung (blau), Abschnürung und Sortierung (gelb) sowie Andockung (lila) und Fusion (grün) unterteilt (Lizenznummer: 2885350789322).

Nach der Abschnürung wandern die Vesikel zum TGN und docken an die Membran an. Dieser Prozess wird als „tethering“ bezeichnet und wird durch „tethering“-Faktoren vermittelt. Die verschiedenen Faktoren werden durch GTPasen der Rab- bzw. Arl- („ADP-ribosylation factor like“) Familie aus dem Zytosol rekrutiert (Sztul und Lupashin, 2006). Als wichtige „tethering“-Komplexe sind vor allem der GARP/VFT-Komplex („Golgi-associated

retrograde transport/Vps fifty three") und COG-Komplex („conserved oligomeric Golgi") zu erwähnen, die die spezifische Interaktion der Vesikel mit den entsprechenden Zielmembranen unterstützen. Zusätzlich sind auch noch weitere einzelne Proteine und Homodimere wie z. B. Imh1p, golgin-245 oder golgin-97 beschrieben, die ebenfalls den komplexen Andockschrift ermöglichen. Am Beispiel des in *S. cerevisiae* am besten charakterisierten GARP/VFT-Komplex können die komplexen Prozesse verdeutlicht werden. Der Komplex setzt sich aus den vier Untereinheiten Vps51p, Vps52p, Vps53p und Vps54p zusammen (Conibear und Stevens, 2000). Dieser interagiert sowohl mit der Rab-GTPase Ypt6p, die das Homolog zum säugerspezifischen Rab6 darstellt, als auch mit dem t-SNARE Tlg1p (Fridmann-Sirkis *et al.*, 2006; Siniosoglou und Pelham, 2001). Ypt6p steuert durch die GTP-Hydrolyse neben der Rekrutierung des GARP-Komplexes auch die Vesikelfusion und wird wiederum durch die Nukleotidaustauschfaktoren Ric1p und Rgp1p reguliert (Siniosoglou *et al.*, 2000). Durch die Anlagerung der „tethering"-Faktoren wird die Zusammenlagerung der SNARE-Komplexe erleichtert. Dabei kommt es zur Interaktion zwischen den v-SNAREs des Transportvesikels und den t-SNAREs auf der Membran des TGN, was letztendlich zur Fusion und Abgabe des Frachtproteins führt (Bonifacino und Rojas, 2006). Die Vielzahl verschiedener SNARE-Proteine (mehr als 20 bei *S. cerevisiae* und 30 beim Menschen) sowie deren Kombination mit unterschiedlichen Andockfaktoren ergibt eine Fülle von Kombinationsmöglichkeiten, die zur Spezifität der Transportprozesse beitragen und zugleich deren Untersuchung erschweren (Hong, 2005). Prinzipiell laufen die Prozesse beim COG-Komplex ähnlich ab, wobei die GTPase Ypt1p sowie das t-SNARE Sed5p dort die Funktionen von Ypt6p und Tlg1p übernehmen (Ungar *et al.*, 2006).

Die Transportmaschinerie vom Endosom zum TGN stellt somit ein hoch komplexes Netzwerk aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten und Transportwege dar. Diese sind neben der Bildung von Vesikeln auch für die Rekrutierung spezifischer Andockfaktoren sowie für die Regulation der Verschmelzung der Vesikel mit dem Zielkompartiment zuständig. Mittlerweile deuten die Untersuchungen darauf hin, dass ein dynamisches Netzwerk (TEN) vorhanden ist, welches die retrograden Prozesse steuert und koordiniert (Bonifacino und Rojas, 2006). Auch viele Toxine, darunter Ricin, machen sich die zelleigenen, retrograden Transportmechanismen zu Nutze, um das Zytosol der Zielzelle zu erreichen.

Neben dem retrograden Endosom-Golgi-Transport besitzen Säuger- und Hefezellen auch die Möglichkeit, ER-residente Proteine wie etwa das Chaperon BiP (Kar2p) nach Modifikation in Golgi und ER sowie die für die Vesikelfusion benötigten Proteine, wie z. B. SNAREs, vom

Golgi zurück in das ER zu transportieren (Beh und Rose, 1995; Johannes und Römer, 2010; Raykhel *et al.*, 2007; Townsley *et al.*, 1993). Dieser Rückhalte Mechanismus dient dazu, die korrekte Lokalisation der Proteine zu gewährleisten. In Säugern sind bislang drei unterschiedliche KDEL-Rezeptoren beschrieben, wohingegen in Hefen nur der HDEL-Rezeptor Erd2p bekannt ist. Erd2p bindet überwiegend an HDEL- bzw. DDEL-tragende Proteine, wobei die säugerspezifischen Rezeptoren unterschiedliche Spezifitäten besitzen und in der Lage sind, eine Vielzahl verschiedener Motive, darunter KDEL, HDEL oder REDL zu erkennen (Eisfeld *et al.*, 2000; Raykhel *et al.*, 2007; Semenza *et al.*, 1990). Auch einige Toxine wie z. B. Cholera-Toxin (KDEL) und *Pseudomonas* Exotoxin A (REDLK) besitzen derartige Retentionsmotive, die deren retrograden Transport zum ER vermitteln (Jackson *et al.*, 1999; Majoul *et al.*, 1998). Prinzipiell beruht der Mechanismus der ER-Retention auf einem pH-Gradienten zwischen dem neutralen ER und dem sauren Milieu des Golgi-Apparates. Bei saurem pH findet die Bindung zwischen Rezeptor und Liganden statt. Nach der Bindung wird der Rezeptor-Liganden-Komplex in COPI-Vesikel verpackt und zurück zum ER befördert, wobei der Ligand aufgrund des neutralen Milieus im ER-Lumen freigesetzt wird (Wilson *et al.*, 1993).

Die COPI-Vesikel bestehen aus sieben Untereinheiten (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -COP), die sowohl im Säuger als auch in Hefen hoch konserviert sind (Duden, 2003; Gaynor *et al.*, 1998). Die α -, β - und ϵ -Untereinheit sind dabei in der Lage, an KKXX-Motive zu binden (Letourneur *et al.*, 1994). Diese Motive sind in Typ1-Transmembranproteinen zu finden und vermitteln deren Rücktransport in das ER (Vincent *et al.*, 1998). Wie schon beim Transport vom Endosom zum Golgi spielt eine GTPase (Arf1p in Hefen) bei der Rekrutierung und Bildung der COPI-Vesikel eine Rolle (Beck *et al.*, 2009). In Hefe kann die GTPase erst nach dem Austausch von GDP zu GTP durch Gea1p und Gea2p an die Golgi-Membran binden und die Vesikelbildung initiieren. Zusätzlich steuern GTPase-aktivierende Proteine, Glo3p und Gcs1p, die Hydrolyse von GTP zu GDP bei Arf1p. Dadurch wird die Einlagerung von Frachtproteinen und v-SNAREs in die Vesikel sowie deren Abschnürung gefördert (Duden, 2003). Obwohl der Hauptteil des retrograden Transports in Eukaryoten durch COPI-Vesikel vermittelt wird, müssen weitere COPI-unabhängige Transportrouten existieren, deren Mechanismen jedoch weitestgehend unbekannt sind (Chen *et al.*, 2002; Storrie *et al.*, 2000). So wird das Shiga-Toxin nach Blockierung der COPI-Vesikel noch effizient zum ER transportiert (Girod *et al.*, 1999). Auch Ricin scheint COPI-unabhängige Wege zu nutzen, weshalb deren Aufklärung das Ziel zukünftiger Studien sein sollte, um effektivere Inhibitoren und Behandlungsstrategien entwickeln zu können (Chen *et al.*, 2003).

1.4 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das Pflanzentoxin Ricin wird nach der Internalisierung retrograd von den frühen Endosomen über den Golgi-Apparat bis zum ER transportiert, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen nur teilweise verstanden sind. Auch in Abwesenheit von RTB führt die Behandlung mit RTA zur Inhibierung der Proteinbiosynthese in Säugerzellen. Zudem kann die *in vivo* Toxizität durch ein zusätzliches KDEL-Retentionssignal stark gesteigert werden. Die dafür verantwortlichen Intoxifikationsrouten sind ebenfalls weitestgehend unbekannt. Angesichts der nach wie vor vorhandenen Wissenslücken über den intrazellulären Transport medizinisch relevanter A/B-Toxine bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die Endozytose und den intrazellulären Transport von wildtypischen und mutierten RTA-Varianten in Säuger- und Hefezellen zu analysieren.

Dazu sollten zunächst unterschiedlich modifizierte und biologisch aktive RTA-Varianten in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Nach Reinigung sollte deren Endozytose und toxische Wirkung in HeLa- und HEK293T-Zellen untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Visualisierung der Internalisierung und des intrazellulären Transports von RTA in Echtzeit durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Toxininfusionen. Dazu sollten biologisch aktive fluoreszenzmarkierte RTA-Fusionen in *E. coli* exprimiert werden, die ein „live cell imaging“ erlauben. Parallel sollte eine mögliche Kolo-kalisation der fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten mit dem säugerspezifischen HDEL-Rezeptor Erd23 nachgewiesen werden.

Des Weiteren sollte die intrazelluläre Expression verschiedener RTA-Varianten in Säugerzellen analysiert werden, um ein Testsystem zur Untersuchung der ER-Zytosol-Retrotranslokation zu etablieren. Ein Knockdown von Sec61 α mittels RNA-Interferenz sollte Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des Sec61-Translokons an der Retrotranslokation der rekombinanten RTA-Varianten in Säugerzellen geben.

Neben den säugerspezifischen Untersuchungen lag ein weiterer Fokus auf der Etablierung hefebasierter Testsysteme. Dadurch sollten die Limitierungen bisheriger RTA-Untersuchungen im Modellorganismus *S. cerevisiae* beseitigen werden, wodurch ein „Screening“ von Hefe-Deletionsmutanten mit Defekten in der Endozytose und dem retrograden Transport möglich sein sollte.

Aufbauend auf den Untersuchungen von Schnöder (2009) sollte abschließend geklärt werden, ob die Prä-Pro-Signalsequenz des viralen A/B-Toxins K28 einen effizienteren ER-Import von RTA als die Prä-Signalsequenz nach intrazellulärer Expression in Hefen vermittelt.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

In Tabelle 1 sind die verwendeten *Escherichia coli* Stämme aufgeführt. Diese wurden aus der Stammsammlung des Institutes für Molekular- und Zellbiologie entnommen. Für Standard-Klonierungsarbeiten wurden die Stämme DH5 α bzw. TOP10 verwendet. Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* erfolgte in BL21 (DE3). Nova Blue Singles wurden bei der AccepTorTM-Klonierung und TOP10F' bei der pYES2.1 TOPO-Klonierung eingesetzt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme sowie deren Herkunft und Genotyp

Stamm	Herkunft/Referenz	Genotyp
DH5 α	Pharmacia (Grant <i>et al.</i> , 1990)	F', λ^- , recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, deoR, Δ (argF-lacZYA9, U196, ϕ 80 lacZ Δ M15)
TOP10	Invitrogen [®] (Durfee <i>et al.</i> , 2008)	F' mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
Nova Blue Singles	Novagen	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+ lacIqZ Δ M15::Tn10](Tet ^R)
BL21 (DE3)	Biomol (Studier und Moffatt, 1986)	F' ompT gal dcm lon hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

2.1.2 Hefen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme (Tabelle 2) wurden, sofern nicht anders vermerkt, der Stammsammlung des Institutes für Molekular- und Zellbiologie entnommen. In Tabelle 3 sind die Deletionsmutanten, die von Open Biosystem (Huntsville, USA) bezogen wurden, aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Hefestämme, deren Herkunft und Genotyp

Stamm	Herkunft/Referenz	Genotyp
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4742	(Winzeler <i>et al.</i> , 1999)	MAT α <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>lys2</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Hefe-Deletionsmutanten (Wildtyp der verwendeten Stämme: BY4742)

ORF	Deletiertes Gen
YNL084C	<i>END3</i>
YDR418W	<i>RPL12B</i>
YBR201W	<i>DER1</i>
YOL013C	<i>HRD1</i>
YDR057W	<i>YOS9</i>
YML008C	<i>ERG6/ISE1</i>
YBL102W	<i>STF2</i>
YDR137W	<i>RGP1</i>
YML067C	<i>ERV41</i>
YLR268W	<i>SEC22</i>
YIL076W	<i>SEC28</i>
YJL036W	<i>SNX4</i>
YKL057C	<i>NUP120</i>
YAL014C	<i>SYN8</i>
YJL053W	<i>PEP8</i>
YJR031C	<i>GEA1</i>

ORF	Deletiertes Gen
YOR069W	<i>VPS5</i>
YOR132W	<i>VPS17</i>
YHR012W	<i>VPS29</i>
YJL154C	<i>VPS35</i>
YKR020W	<i>VPS51</i>
YDR484W	<i>VPS52</i>
YDR027C	<i>VPS54</i>
YER122C	<i>GLO3</i>
YCL001W	<i>RER1</i>
YDR425W	<i>SNX41</i>
YAL030W	<i>SNC1</i>
YLR262C	<i>YPT6</i>
YDL226C	<i>GCS1</i>
YOL018C	<i>TLG2</i>
YPL232W	<i>SSO1</i>

2.1.3 Säugerzelllinien

In Tabelle 4 sind die verwendeten Zelllinien aufgeführt, die der Stammsammlung des Institutes für Molekular- und Zellbiologie entnommen wurden.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Zelllinien sowie deren Herkunft und Merkmale

Zelllinie	Herkunft/Referenz	Beschreibung/Merkmale
HeLa-S3	ATCC (CCL-2.2™)	humane Cervix-Karzinomzelllinie, virus-transformiert, epitheliale Zellen, Monolayer
HEK293T	DSMZ (ACC 635)	humane embryonale Nierenzelllinie, Fibroblasten-Zellen, Monolayer

2.2 Plasmide

Im Nachfolgenden sind die für die Zwischenklonierung, Sequenzierung und DNA-Amplifikation verwendeten Plasmide aufgelistet (Tabelle 5). Die erstellten Expressionsplasmide und deren dazugehörige Grundvektoren sind separat in Punkt 2.2.2 aufgeführt. Im Punkt 2.2.3 sind die entsprechenden Plasmidkarten der einzelnen Grundvektoren schematisch dargestellt.

2.2.1 Zwischenklonierung, Sequenzierung und PCR-Templates

In Tabelle 5 sind die eingesetzten Plasmide für die Zwischenklonierung, Amplifikation und Sequenzierung und deren Herkunft und Eigenschaften dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide zur DNA-Amplifikation, Zwischenklonierung und Sequenzierung

Bezeichnung	Herkunft/Referenz	Eigenschaften/Verwendung
PCR-Templates		
pRS316-Kar2 _{SP} -RTA	(Allen <i>et al.</i> , 2007)	Template für RTA
pJC2433gem-pre_RTΔ _{delta}	J. C. Cook, University of Warwick, UK	Template für RTA ^{E177D}
pCMV-eGFP	(Walch, 2009)	Template für eGFP
pCA38-PPL	R. Zimmermann, Uds	Template für Signalsequenz von Präprolactin
pPGK-M28-I	(Schmitt, 1995)	Template für K28pp-Signalsequenz

Bezeichnung	Herkunft/ Referenz	Eigenschaften/Verwendung
Zwischenklonierung		
pRS316P _{Gal1} - Erd2.93-V5-Suc2A- His3CYC1TT	(Gießelmann, 2007)	centromerer Expressionsvektor mit <i>Erd2.93</i> und <i>V5-SUC2A-HIS3</i> Reportersystem (<i>XhoI/BamHI</i>) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pSTBlue-RTA	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA
pSTBlue-RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{E177D}
pSTBlue-KozakPL _{SS}	diese Arbeit	pSTBlue mit Präprolactin _{SS} und vorgeschalteter Kozak-Sequenz
pSTBlue-RTA _{His}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA und C-terminalem His-Tag
pSTBlue-RTA _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA und C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pSTBlue-RTA _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA und C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
pSTBlue-RTA ^{E177D} _{His}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{E177D} und C-terminalem His-Tag
pSTBlue-RTA ^{E177D} _{HisHDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{E177D} und C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pSTBlue-RTA ^{E177D} _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{E177D} und C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
pSTBlue-RTA ^{R180H} _{His}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{R180H} und C-terminalem His-Tag
pSTBlue-RTA ^{R180H} _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{R180H} und C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pSTBlue-RTA ^{R180H} _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-RTA ^{R180H} und C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
pSTBlue-K28pp _{SS} -RTA	diese Arbeit	pSTBlue mit K28prepro _{SS} und Vollängen-RTA
pSTBlue-K28pp _{SS} -RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pSTBlue mit K28prepro _{SS} und Vollängen-RTA ^{E177D}
pSTBlue-eGFP	diese Arbeit	pSTBlue mit Vollängen-enhanced GFP
Sequenzierung		
pSTBlue-1	Novagen	<i>Amp^R</i> , <i>IRES^R</i> , T7-, SP6-Promotor, LacZα-Reporter-Gen

2.2.2 Expressions- und Kontrollplasmide

In Tabelle 6 sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressions- und Kontrollplasmide und deren Grundvektoren dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Expressions- und Kontrollplasmide und deren Grundvektoren

Bezeichnung	Herkunft/ Referenz	Eigenschaften/Verwendung
<i>E. coli</i>		
pET24a ⁽⁺⁾	Novagen	Expressionsvektor, Kan ^R , T7-Tag-Sequenz, His ₆ -Tag, IPTG-induzierbarer T7-Promotor
pET-RTA _{His}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem His-Tag
pET-RTA _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pET-RTA _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
pET-RTA ^{E177D} _{His}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{E177D} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem His-Tag
pET-RTA ^{E177D} _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{E177D} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pET-RTA ^{E177D} _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{E177D} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
pET-RTA ^{R180H} _{His}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{R180H} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem His-Tag
pET-RTA ^{R180H} _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{R180H} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pET-RTA ^{R180H} _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-RTA ^{R180H} (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pET-eGFP-RTA _{His}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-eGFP und RTA (<i>Nhe</i> I/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem His-Tag
pET-eGFP-RTA _{His} ^{HDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-eGFP und RTA (<i>Nhe</i> I/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL und His-Tag
pET-eGFP-RTA _{His} ^{KDEL}	diese Arbeit	pET24a ⁽⁺⁾ mit Vollängen-eGFP und RTA (<i>Nhe</i> I/ <i>Sal</i> I) zur heterologen Expression mit C-terminalem ER-Retentionssignal KDEL und His-Tag
<i>S. cerevisiae</i>		
pRS316	(Sikorski und Hieter, 1989)	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), „autonomously replicating sequence“ (ARS), URA3- und Amp ^R -Gen

Bezeichnung	Herkunft/ Referenz	Eigenschaften/Verwendung
<i>S. cerevisiae</i>		
pRS316-Kar _{2SS} -RTA ^{E177D}	(Schnöder, 2009)	pRS316 mit Kar _{2SS} und Volllängen-RTA ^{E177D} (<i>EcoRI/SalI</i>) zur intrazellulären Expression
pRS316-K28pp _{SS} -RTA	diese Arbeit	pRS316 mit K28pp _{SS} und Volllängen-RTA (<i>EcoRI/SalI</i>) zur intrazellulären Expression
pRS316-K28pp _{SS} -RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pRS316 mit K28pp _{SS} und Volllängen-RTA ^{E177D} (<i>EcoRI/SalI</i>) zur intrazellulären Expression
pRS315	(Sikorski und Hieter, 1989)	identisch zu pRS316, <i>LEU2</i> -Gen anstelle von <i>URA3</i>
pRS315-K28 _{SS} -GFP	(Schnöder, 2009)	pRS315 mit K28 _{SS} und Volllängen-GFP (<i>EcoRI/SalI</i>) zur intrazellulären Expression
Säugerzellen		
pmCherry-N1-Erd2.3-mCherry	(Gießelmann, 2007)	pmCherry mit Volllängen-Erd2.3 und C-terminalem Volllängen-mCherry zur intrazellulären Expression
pAcGGSM2-IRES-GFP	V. Flockerzi, Universität des Saarlandes	pAcGGsM2 mit IRES-GFP Sequenz zur Überprüfung der Transfektionseffizienz (FACS)
pmCherry-N1	Clontech	Expressionsvektor, <i>Kan^R</i> , enthält mCherry-Sequenz, konstitutiver <i>CMV</i> -Promotor und <i>SV40</i> -Terminator
pmCherry-RTA	diese Arbeit	pmCherry mit Volllängen-RTA und vorgeschalteter Kozak-Sequenz (<i>EcoRI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression
pmCherry-RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pmCherry mit Volllängen-RTA ^{E177D} und vorgeschalteter Kozak-Sequenz (<i>EcoRI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression
pmCherry-PL _{SS} -RTA	diese Arbeit	pmCherry mit PL _{SS} und Volllängen-RTA und vorgeschalteter Kozak-Sequenz (<i>NheI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression
pmCherry-PL _{SS} -RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pmCherry mit PL _{SS} und Volllängen-RTA ^{E177D} und vorgeschalteter Kozak-Sequenz (<i>NheI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression
<i>in vitro</i> Translation		
pJC2433gem-pre_RTΔ _{delta}	J.C. Cook, University of Warwick, UK	Klonierungsvektor für <i>in vitro</i> Synthese; enthält pre-RTΔ (<i>EcoRI/XhoI</i>); <i>Amp^R</i> -Gen; T7- und SP6-Promotor
pGEM-RTA ^{E177D}	(Schnöder, 2009)	pGEM mit Volllängen-RTA ^{E177D} (<i>EcoRI/XhoI</i>) zur <i>in vitro</i> Synthese
pGEM-K28pp _{SS} -RTA ^{E177D}	diese Arbeit	pGEM mit K28pp _{SS} und Volllängen-RTA ^{E177D} (<i>EcoRI/SalI</i>) zur <i>in vitro</i> Synthese, <i>XhoI</i> -Restriktionsschnittstelle im Vektor zerstört durch <i>SalI</i> -Klonierung

2.2.3 Plasmidkarten

Im nachfolgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Grundplasmide für die Zwischenklonierung (Punkt 2.2.3.1) und Expression (Punkt 2.2.3.2) sowie deren Eigenschaften graphisch dargestellt.

2.2.3.1 Zwischenklonierung

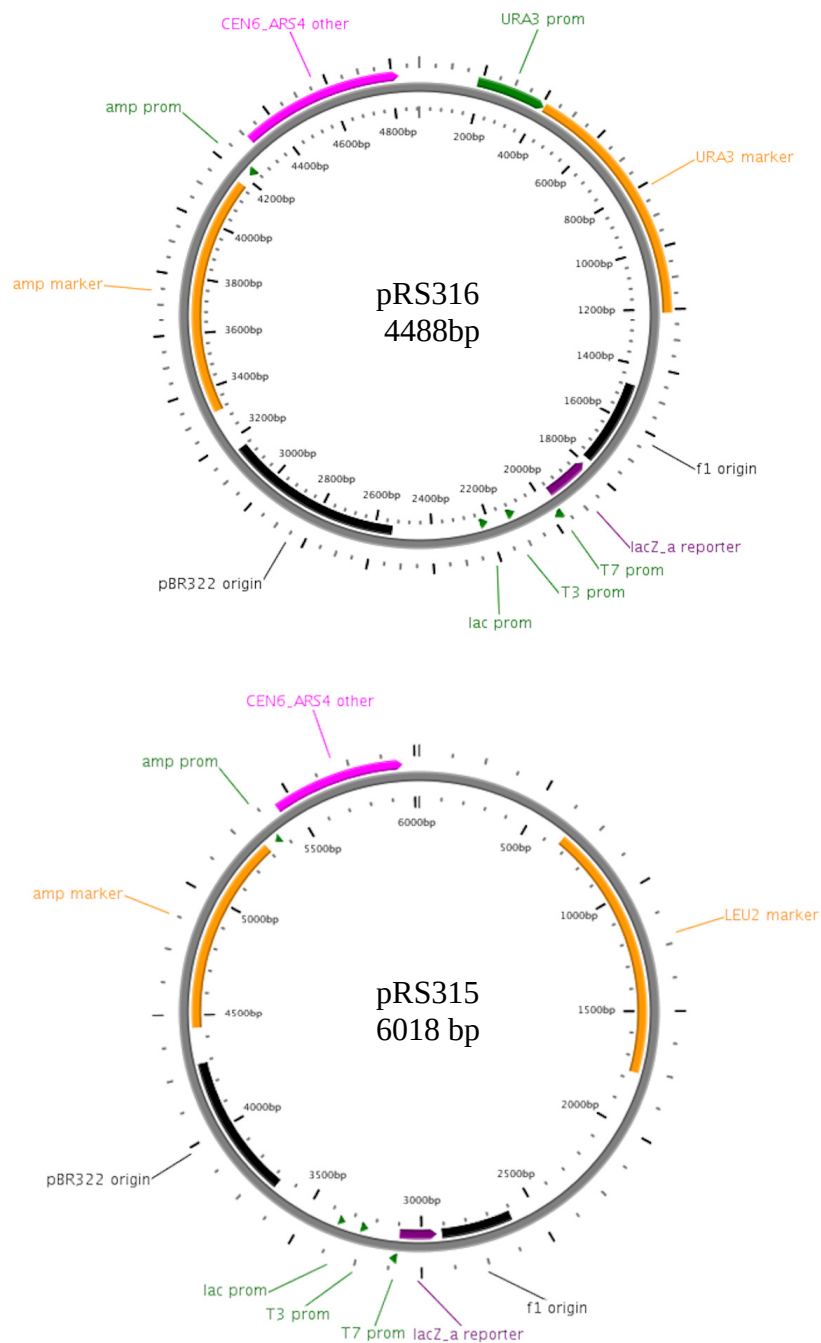


Abbildung 7: Übersicht über die verwendeten Zwischenklonierungsvektoren (orange = Markersequenzen, schwarz = Replikationsursprünge, violett = Reportergene, grün = Promotoren, pink = autonom replizierende Sequenzen).

2.2.3.2 Expressionsplasmide

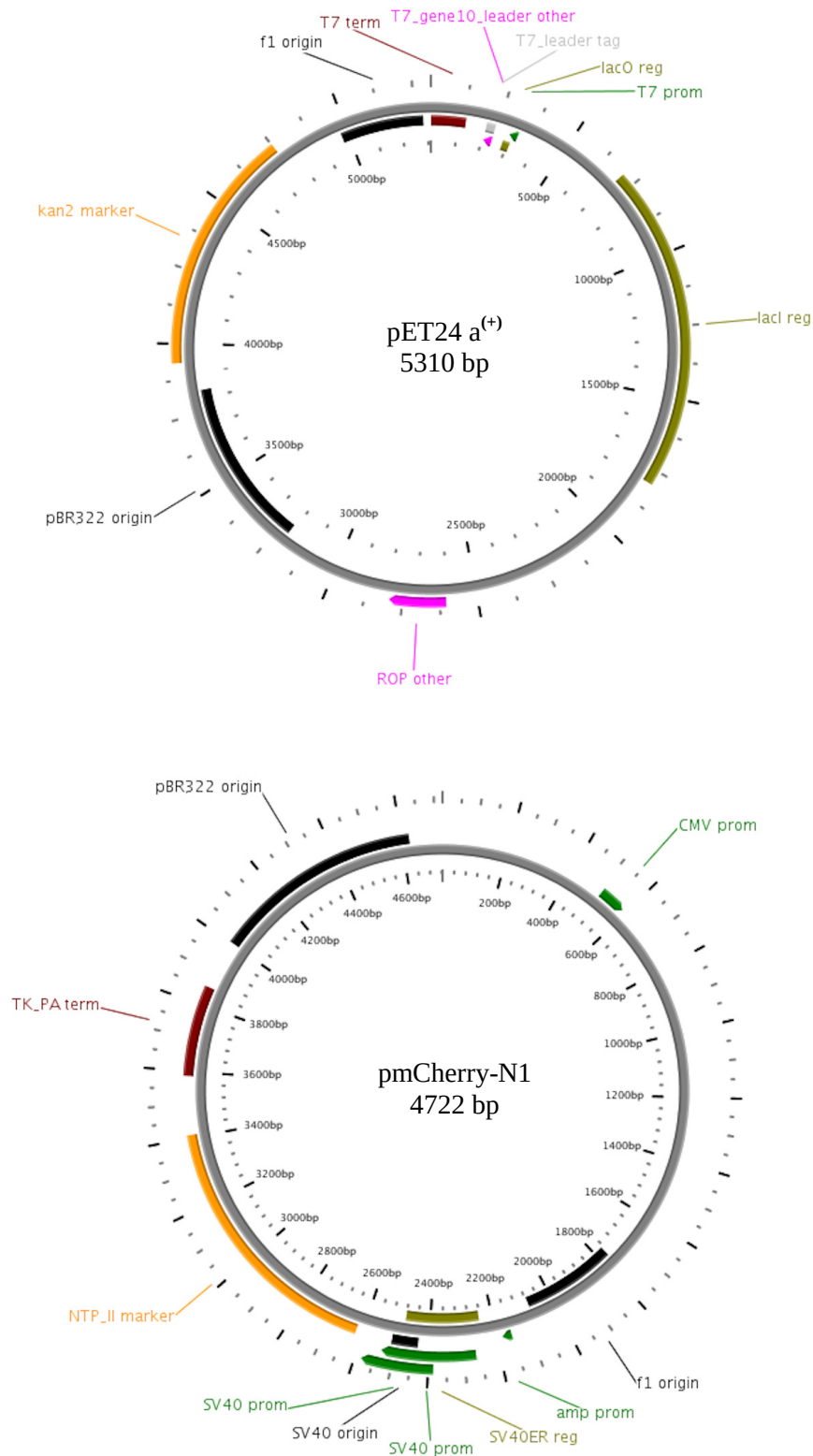


Abbildung 8: Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren (grün = Promotoren, orange = Markersequenzen, schwarz = Replikationsursprünge, violett = Reportergene, grau = TAG-Sequenzen, dunkelrot = Terminatorsequenzen, oliv = Regulatorsequenzen, pink = andere Gene).

2.3 Materialien

In den nachfolgenden Tabellen sind die wichtigsten der verwendeten Arbeitsmaterialien, wie Antikörper (Tabelle 7), RNA-Oligonukleotide (Tabelle 8), Chemikalien, Enzyme, Kits (Tabelle 9) und Restriktionsendonukleasen aufgeführt.

2.3.1 Antikörper

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper sowie deren Herkunft sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
Anti-RTA	polyklonaler, primärer Sheep-AK	L. Roberts, University of Warwick, UK	1 :1000
Anti-Sec61 α_{A1}	polyklonaler, Peptid-AK aus Hase gegen die letzten 12 AS des C-Terminus	R. Zimmermann Universität des Saarlandes	1:200
Anti- β -Aktin	muriner, monoklonaler, primärer AK	Abcam (ab8224)	1:1000
Anti-GFP	muriner, monoklonaler, primärer AK	Roche (11814460001)	1:1000
Anti-His	muriner, monoklonaler, primärer AK	AbD serotech (MCA1396)	1:500
Anti-FLAG [®] M2	muriner, monoklonaler, primärer AK	Sigma (F3165)	1:1000
Anti-Mouse-HRP	monoklonaler, sekundärer AK, HRP gekoppelt	Sigma (A4416)	1:13000
Anti-Sheep-HRP	monoklonaler, sekundärer AK, HRP gekoppelt	Sigma (A3415)	1:13000
Anti-Rabbit-HRP	monoklonaler, sekundärer AK, HRP gekoppelt	Sigma (A9169)	1:1000
Anti-Sheep-FITC	polyklonaler, sekundärer AK, FITC gekoppelt	Sigma (F7634)	1:100 (Immunfluoreszenz)

Zur Normierung der Säugerzellproben in der Western-Analyse wurde der Anti- β -Aktin Antikörper verwendet. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurde der FITC-gekoppelte Anti-Sheep Antikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden die Meerrettich-Peroxidase konjugierten Anti-Sheep, Anti-Rabbit und Anti-Mouse Antikörper benutzt.

2.3.2 RNA-Oligonukleotide

In Tabelle 8 sind die verwendeten RNA-Oligonukleotide (siRNAs) näher beschrieben.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten RNA-Oligonukleotide (siRNAs).

Bezeichnung	Gen	Herkunft	Sense-Sequenz
Sec61A ₁ -UTR	Sec61A ₁	Qiagen	CACUGAAAUGUCUACGUUUTT
ctrl siRNA	-	Qiagen	AllStar Negative Control

2.3.3 Chemikalien, Enzyme und Kits

In Tabelle 9 sind die wichtigsten zum Einsatz gekommen Chemikalien, Enzyme und Kits tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits. Die restlichen Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Merck bzw. Applichem bezogen.

Firma, Firmensitz	Materialien und Kits
ANALYTIC JENA, Jena	innuPREP Plasmid Mini Kit
APPLICHEM, Darmstadt	X-Gal, T4-DNA Ligase, Magermilchpulver, Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol
BIOCHROM, Berlin	PBS Dulbecco
BIORAD, München	Elektroporationsküvetten, Whatman Blotting-Papier
BIOZYM, Hameln	Agarose
DIFCO, Detroit (USA)	YNB („Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate“)
EUROGENTEC, Serainv (Belgien)	Smart Ladder
FERMENTAS, St. Leon-Rot	DNase-freie RNase A, Restriktionsenzyme und -puffer, dNTPs, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Low Range DNA Ladder
GE HEALTHCARE, München	Protein A Sepharose, HisTrap™ HP-Säulen
INVITROGEN®, Karlsruhe	OPTI-MEM®, DMEM+GlutaMAX™ I, Gibco® PBS
MARCOR, New Jersey (USA)	Agar-Agar, Pepton, Hefeextrakt
MILLIPORE, Eschborn	Dialysefilter
MÜLLERS MÜHLE, Gelsenkirchen	Glukose
NALGENE CRYOWARE, Rochester (USA)	Kryoröhrchen
NEB, Frankfurt	EndoH

Firma, Firmensitz	Materialien und Kits
NOVAGEN, Darmstadt	pSTBlue-1 AccepTor TM Vector Kit, Nanofectin Kit
NUNC, Rochester (USA)	96 Well-Mikrotiterplatten
QIAGEN, Hilden	HiPerFect Transfection Reagenz, PolyFect Transfektionsreagenz
OMEGA BIOTEK, Norcross (USA)	„E.Z.N.A. [®] Gel Extraction Kit“
PAA, Pasching (Österreich)	Nanofectin Kit, Trypsin/EDTA
PERKIN ELMER, Waltham (USA)	Easytag Express [³⁵ S] Protein Labeling Mix, C ¹⁴ -Marker
PIERCE, Rockford (USA)	SuperSignal [®] West Dura Kit, BCA-Protein Assay Kit
PRESENS, Regensburg	96 Well SensorPlate (Oxoplate, round bottom)
ROCHE, Mannheim	Fast Start High Fidelity PCR system, dNTP Pack, Nonidet P40, PVDF-Membran, Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei), β -Glucuronidase/Arylsulfatase, WST-1 Reagent
ROTH, Karlsruhe	Rotilabo [®] -Spritzenfilter
SARTORIUS, Göttingen	Vivaspin 20-Ultrafiltrationseinheiten
SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo (Japan)	Zymolyase TM 20T und 100T
SERVA, Heidelberg	β -Mercaptoethanol, Coomassie Brilliant Blue, Triton X-100, DMSO
SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen	Ampicillin, Bromphenolblau, Taq-DNA-Polymerase, Heringssperma-DNA, Acrylamid, TEMED, <i>in vitro</i> Toxicology Assay Kit (TOX2, XTT based), Trypanblau, PMSF
THERMO SCIENTIFIC, Waltham (USA)	CL-Xposure TM Film
VECTOR LABORATORIES (USA)	Rhodamine labeled RCA

2.3.4 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Fermentas bzw. Roche bezogen.

2.3.5 Oligonukleotide

In Tabelle 10 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer aufgelistet. Die dargestellten Primer wurden mit Hilfe des Programms Lasergene 7.0 der Firma DNASTAR entwickelt und von den Firmen Sigma-Genosys und Biomers synthetisiert.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotid-Primer. Die Restriktionsschnittstellen sind über den entsprechenden Sequenzen angegeben; Start- bzw. Stopp-Kodons sind **fett** hervorgehoben; die Linker- und TAG-Sequenzen sind unterstrichen; ER-Retentionssignale sind *kursiv* dargestellt; die Leserichtung der jeweiligen Sequenzen entspricht 5'→3' (LS = Linkersequenz; Li = Linker; His = 6 x His-Tag; SS = Signalsequenz).

Nr	Bezeichnung	5'→3'-Sequenz	Verwendung
1	5'-RTA _{coli}	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> GAATTC GGATCC ATG ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT ATA AAC TTT ACC	RTA _{His} ^{HDEL} , RTA _{His} ^{KDEL} , RTA _{His} und der mutierten E177D/R180H-Varianten sowie für die eGFP-RTA-Konstrukte
2	5'-RTA _{Säuger}	<i>XbaI</i> <i>BamHI</i> <i>EcoRI</i> TCTAGA GGATCC GAATTC ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT ATA AAC TTT ACC	PL _{SS} -RTA bzw. PL _{SS} -RTA ^{E177D} für intrazelluläre Expression in Säugerzellen
3	3'-RTA _{His}	<i>HindIII</i> <i>Sall</i> AAGCTT GTCGAC TTA <u>ATG ATG ATG</u> <u>ATG ATG ATG</u> AAA CTG TGA CGA TGG TGG AGG TGC	RTA _{His} , RTA ^{E177D} _{His} , RTA ^{R180H} _{His}
4	3'-RTA _{His} ^{HDEL}	<i>HindIII</i> <i>Sall</i> AAGCTT GTCGAC TTA <i>CAG TTC ATC</i> <i>ATG ATG ATG ATG ATG ATG</i> AAA CTG TGA CGA TGG TGG AGG TGC	RTA _{His} ^{HDEL} , RTA ^{E177D} _{His} ^{HDEL} , RTA ^{R180H} _{His} ^{HDEL}
5	3'-RTA _{His} ^{KDEL}	<i>HindIII</i> <i>Sall</i> AAGCTT GTCGAC TTA <i>CAG TTC ATC</i> <i>TTT ATG ATG ATG ATG ATG</i> AAA CTG TGA CGA TGG TGG AGG TGC	RTA _{His} ^{HDEL} , RTA ^{E177D} _{His} ^{KDEL} , RTA ^{R180H} _{His} ^{KDEL}
6	5'-RTA ^{R180H} - SOE	CAG AAG CAG CAC ACT TCC AAT ATA TTG AGG	Mutagenese von RTA zu RTA ^{R180H}
7	3'-RTA ^{R180H} - SOE	CCT CAA TAT ATT GGA AGT GTG CTG CTT CTG	Mutagenese von RTA zu RTA ^{R180H}
8	5'-eGFP	<i>XbaI</i> <i>NheI</i> TCTAGA GCTAGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAGC	eGFP für eGFP-RTA- Konstrukte
9	3'-eGFP	<i>Sall</i> <i>BamHI</i> GTCGAC TTA GGATCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G	eGFP für eGFP-RTA- Konstrukte
10	5'-RTA _{Kozak}	<i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> AAGCTT GAATTC GGATCC GCC ACC ATG ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT ATA AAC TTT ACC	RTA, RTA ^{E177D} für intrazelluläre Expression in Säugerzellen
11	3'-RTA	<i>KpnI</i> <i>NotI</i> <i>XbaI</i> GGTACC GCGGCCGC TCTAGA TTA AAA CTG TGA CGA TGG TGG AGG TGC	RTA, RTA ^{E177D} für Expression in Säugerzellen
12	5'-Präprolactin	<i>NheI</i> <i>BglII</i> <i>XhoI</i> GCTAGC AGATCT CTCGAG GCC ACC ATG GAC AGC AAA GGT TCG TCG CAG	Säugerkonstrukte pmCherry- PL _{SS} -RTA/RTA ^{E177D}
13	3'-Präprolactin	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i> GAATTC AAGCTT GGA GAC CAC ACC CTG GCA CAA GAG	Säugerkonstrukte pmCherry- PL _{SS} -RTA/RTA ^{E177D}
14	5'-K28 _{SS}	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> CTCGAG GAATTC ATG GAG AGC GTT TCC TCA TTA TTT AAC ATT TTT TC	K28pp _{SS} -RTA/RTA ^{E177D} für <i>in vitro</i> Translation
15	3'-RTA _{in vitro}	<i>NotI</i> <i>Sall</i> GCGGCCGC GTCGAC TTA AAA CTG TGA CGA TGG TGG AGG TGC G	K28pp _{SS} -RTA/RTA ^{E177D} für <i>in vitro</i> Translation

Nr	Bezeichnung	5'→3'-Sequenz	Verwendung
16	5'-K28pp _{ss} -RTA-SOE	GAG AGA CAG CAG GGC TTA GAA GAA CGT ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT ATA AAC TTT AC	K28pp _{ss} -RTA/RTA ^{E177D} für <i>in vitro</i> Translation
17	3-K28pp _{ss} -RTA-SOE	GTA AAG TTT ATA ATT GGG TAT TGT TTG GGG AAT ATA CGT TCT TCT AAG CCC TGC TGT CTC TC	K28pp _{ss} -RTA/RTA ^{E177D} für <i>in vitro</i> Translation

2.4 Kulturbedingungen und Nährmedien

Die aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in H₂O dest. gelöst und durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Agarplatten wurden bei 4°C gelagert; die Lagerung von Flüssigmedien erfolgte in der Regel bei Raumtemperatur.

2.4.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium

Pepton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Zur Herstellung von festen Medien wurden zusätzlich 1,5 % Agar hinzugefügt. Zur Selektion wurde das Nährmedium mit Stammlösungen von Kanamycin bzw. Ampicillin supplementiert.

SOC-Medium

Pepton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
Glukose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
KCl	2,5 mM

Die Glukose-Lösung wurde getrennt autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/ml
EtOH	50 % (v/v)

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG	100 mM
------	--------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	40 mg/ml
Dimethylformamid	100 % (v/v)

Die Lösung wurde sterilfiltriert und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedien erfolgte bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator Multitron von Infors. Die Inkubation von LB-Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Zur Selektion von plasmidtragenden Kulturen wurden die entsprechenden Flüssigkulturen sowie Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, bzw. 50 µg/ml Kanamycin komplementiert. Im Fall einer Blau-weiß-Selektion (pSTBlue-1) wurden zusätzlich 40 µl X-Gal-Stammlösung und 40 µl IPTG-Stammlösung auf den Agarplatten ausgebracht. Bei der Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte die Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen von 20°C oder 28°C (Punkt 3.1.1; Punkt 3.2.1). Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 2. In Tabelle 1 sind die verwendeten *E. coli* Stämme aufgelistet und näher charakterisiert.

2.4.2 Kultivierung von Hefen

YNB-Stammlösung

YNB w/o aminoacids and (NH ₄) ₂ SO ₄	17 g/l
--	--------

Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

Synthetisches SC- bzw. Drop-out-Medium

Glukose	2 %
(bzw. Galaktose/Raffinose	3 %/2 %)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 %
Drop-Out/SC-Mix	0,85 g/l
YNB	1,7 g/l

Zur Herstellung von festem Medium wurde zusätzlich 1,5 % Agar hinzugefügt. Die Glukose bzw. Galaktose/Raffinose wurde getrennt autoklaviert und das YNB nachträglich als sterilfiltrierte Stammlösung zugegeben. Die zugesetzte Puffermenge ergab eine 20 mM Pufferung bei pH 7,0.

YPD-Medium

Glukose	2 %
Pepton	2 %
Hefeextrakt	1 %

Zur Herstellung von festem Medium wurde zusätzlich 1,5 % Agar hinzugefügt. Die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

SC- bzw. Drop-Out-Mix

Adenin	0,4 g	Phenylalanin	1,0 g
Arginin	0,4 g	Threonin	4,0 g
Histidin	0,4 g	Tryptophan	0,4 g
Isoleucin	0,6 g	Tyrosin	0,6 g
Leucin	2,0 g	Uracil	0,4 g
Lysin	0,6 g	Valin	3,0 g
Methionin	0,4 g		

Die Grammangaben geben exemplarisch die Einwaagen für 14,2 g SC-Mix-Pulver an. Bei Drop-Out-Medien wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) ausgelassen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* BY4742 wurden ausschließlich die oben aufgeführten Standard-Medien verwendet. Die Anzucht der Kulturen in Flüssigmedien erfolgte bei 30°C und 220 rpm im Schüttelinkubator Multitron von Infors; die Kultivierung auf festen Medien erfolgte im Brutschrank bei 30°C für 3-5 d. Kulturen plasmidfreier Zellen wurden in YPD-

Medium über Nacht angezogen. Die Selektion plasmidtragender Klone erfolgte auf den jeweiligen d/o-Glukose-Agarplatten im Brutschrank. Zur Induktion der Galaktose-induzierbaren Promotoren wurden die Kulturen auf d/o-Galaktose-Agarplatten bzw. Flüssigmedium geschiftet und bei 30°C und 220 rpm kultiviert.

2.4.3 Kultivierung von Säugerzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um adhärent wachsende Zellen, welche der Stammsammlung des Institutes für Molekular- und Zellbiologie entnommen wurden. Die Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgeführt und dort näher charakterisiert. Beide Zelllinien wurden in DMEM-Medium, wenn nicht anders beschrieben, unter Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank HeraCell150 von Thermo Scientific kultiviert. Nach 3-4 d wurden die Zellen in frisches Medium passagiert. Das Split-Verhältnis betrug dabei 1:3, 1:5 oder 1:10.

Zur Ernte von HeLa-Zellen wurden diese mit 1 x PBS gewaschen und 3 min mit 1 x Trypsin/EDTA inkubiert. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde anschließend das Trypsin inhibiert und die gelösten Zellen in Kulturflaschen ausgesät. HEK293T Zellen hingegen wurden mit 1 x PBS gewaschen und danach nach Zugabe von 1 x PBS unter kräftigen Schütteln abgelöst. Abschließend erfolgte wiederum die Aussaat in Kulturflaschen.

2.4.4 Kryokulturen

Die langfristige Lagerung der Mikroorganismen erfolgte in Dauerkulturen. Dabei wurde 1 ml einer frischen Übernacht-Kultur mit 1 ml 99 %-igem sterilem Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung von Säugerzelllinien wurden pro Kryoröhrchen 2×10^6 Zellen in 10 % DMSO-haltigem Kulturmedium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5 Zellzahlbestimmung

2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl von Hefekulturen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, Paul Marienfeld), deren Kammertiefe 0,1 mm betrug, durchgeführt. Bei Säugerkulturen kam die Zählkammer Neubauer bright-line von Paul Marienfeld mit einer Kammertiefe von 1 mm zum Einsatz.

2.5.2 Bestimmung der Optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte von Kulturansätzen wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm an einem Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro von Amersham Biosciences bestimmt. Die Schichtdicke der verwendeten Küvetten betrug dabei 1 cm. Das entsprechende unbeimpfte Medium wurde zur Bestimmung der Referenz eingesetzt.

2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der erhaltenen DNA erfolgte mittels GeneQuant des Herstellers Pharmacia Biochrom. Das Prinzip beruht dabei auf der Messung der unterschiedlichen Absorptionsspektren von DNA und Proteinen. Dazu werden die Absorptionswerte bei $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum von DNA) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren) gemessen. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} wird als Maß für die Reinheit der DNA herangezogen. Reine DNA zeigt einen ungefähren Wert von 1,8 an, während Verunreinigungen durch Proteine einen kleineren Wert ergeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1:60-Verdünnung der vorhandene DNA-Probe gegen H₂O dest. in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Mit der erhaltenen Absorption errechnete das verwendete Gerät die DNA-Konzentration der Probe.

2.7 Standardmethoden zur DNA-Manipulation

2.7.1 Methoden zur Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Plasmid-DNA mittels alkalische Lyse oder MiniPrep aus den Bakterienzellen isoliert.

2.7.1.1 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zu gewinnen. Die Durchführung erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Birnboim (1983).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 min bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert. Eine vollständige Resuspension ist dabei notwendig, um später eine hohe DNA-Konzentration zu erhalten. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS wurde die Lösung vorsichtig durch Invertieren gemischt und 2-5 min bei RT

inkubiert, bis eine klare Lösung entstand. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 150 µl Kaliumacetat und die Fällung der Proteine und DNA wurde 2 min auf Eis durchgeführt. Die Präzipitate wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm pelletiert und 400 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 800 µl 99 %-igem Ethanol 5 min bei RT gefällt und danach 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 20 µl H₂O dest. resuspendiert. Die Aufbewahrung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

GTE-Lösung

Glukose	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

5 M Kaliumacetat-Lösung

Eisessig 99,5 %	29,5 %
-----------------	--------

Der pH-Wert wurde mit KOH-Plätzchen auf 4,8 eingestellt.

2.7.1.2 innuPrep Plasmid Mini Kit

Eine alternative Möglichkeit zur Plasmid-Isolierung aus Bakterien stellt die MiniPrep-Isolierung dar. Das Prinzip bei dem hier verwendeten „innuPREP Plasmid Mini Kit“ von Analytik Jena beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit darauf folgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Matrix einer Zentrifugationssäule. Die DNA wird anschließend durch mehrere Waschschrte gereinigt und kann mit Hilfe von H₂O dest. oder einem Niedrig-Salz-Puffer vom Filtermaterial eluiert werden. Die Plasmidisolierung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Sequenzen mittels Standard-PCR oder SOE-PCR amplifiziert und über TOPO- bzw. AccepTorTM-Klonierung in die Klonierungsvektoren (Tabelle 5) eingebracht.

2.7.2.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wurde von Kary Mullis (1993) entwickelt und wird zur *in vitro* Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten eingesetzt. Bei dieser Methode kommt es durch eine thermostabile DNA-Polymerase zu einer zyklisch wiederholten Verdopplung der DNA (Saiki *et al.*, 1988). Der Ablauf eines einzigen von insgesamt 25 bis 30 Zyklen besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Im Allgemeinen wird ein PCR-Ansatz verwendet, der aus mindestens zwei Oligonukleotid-Primern (Tabelle 10), freien Desoxyribonukleotiden (dNTPs), Template-DNA (Tabelle 5), DNA-Polymerase und dem passenden Puffersystem besteht. Die Denaturierung erfolgt durch Kochen der DNA, wodurch sich beide Stränge voneinander trennen. Im Annealingsschritt folgt eine Absenkung der Temperatur unter die spezifische Schmelztemperatur der vorhandenen Primer. Dies ermöglicht deren Hybridisierung mit der einzelsträngigen Template-DNA. In der abschließenden Elongationsphase wird durch die Temperaturerhöhung auf das Optimum der verwendeten Polymerase die Verlängerung der Primersequenzen komplementär zum Templatestrang initiiert. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Amplifikatproduktes.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Standard-PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 x Polymerase Puffer	2,5 µl
dNTPs (25 mM)	0,5 µl
5'-Primer (100 pM)	0,25 µl
3'-Primer (100 pM)	0,25 µl
Template-DNA (1:10 verdünnt)	0,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O dest.	ad 25 µl

Bei Sequenzen unter 1 kbp wurde die *Taq*-Polymerase der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt. Bei DNA-Fragmenten mit mehr als 1 kbp wurde das Fast Start High Fidelity PCR System von

Roche verwendet. In diesem Kit ist ein „proofreading“-Enzym zugesetzt, was zu einer um den Faktor 4 - verglichen mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase - verringerten Fehlerrate von $8,5 \times 10^{-6}$ führt. Zur Amplifikation wurde der Thermocycler Primus96 plus von MWG-Biotech bzw. egradient S von Eppendorf eingesetzt. Dabei wurden die einzelnen Parameter bezüglich der Annealingtemperatur, der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und der verwendeten Polymerase für die jeweiligen Sequenzen angepasst. Die erfolgreiche Amplifikation wurde in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die Standard-PCR verlief nach folgendem Schema:

Initiale Denaturierung	95°C	4 min	} 25-30 x
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	57°C	30 s	
Elongation	72°C	45 s	
Terminale Elongation	72°C	7 min	

2.7.2.2 SOE-PCR

Eine Spezialform der PCR stellt die sogenannte SOE-PCR („Splicing by Overlapping Extensions“) dar. Diese Methode wird eingesetzt, um lückenlose Fusionskonstrukte aus zwei Gensequenzen herzustellen oder innerhalb eines Gens einen Teilbereich zu deletieren. In einer ersten Reaktion werden dabei die einzelnen Gensequenzen getrennt voneinander amplifiziert. Zusätzlich besitzt der 3'-Primer des ersten und der 5'-Primer des zweiten Gens homologe Sequenzen aus den 5'- bzw. 3'-Bereichen des jeweiligen anderen Gens. In einer zweiten Amplifikation werden nun lediglich die flankierenden 5'- bzw. 3'-Primer des späteren Fusionskonstruktes mit den beiden Amplifikaten vereint. Die angefügten, überlappenden Bereiche der Amplifikate können sich nun zusammenlagern, wodurch die DNA-Polymerase in der Lage ist das Fusionskonstrukt vollständig zu replizieren. Der Vorteil dieser Methode ist die Erzeugung von Fusionen ohne störende Spacer-Bereiche durch Restriktionsschnittstellen.

2.7.2.3 *AccepTor*TM-Klonierung

Das „pSTBlue-1 *AccepTor*TM Vector Kit“ von Novagen wurde als Zwischenklonierungsvektor verwendet, um eine Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte zu ermöglichen. Die Durchführung verlief dabei laut Herstellerangaben. Der

pSTBlue-Vektor ist derart konstruiert, dass er eine einfache und effektive Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-dATP Überhängen, die z. B. durch eine *Taq*-Polymerase erzeugt werden, gewährleistet. Der linearisierte Vektor enthält einzelsträngige 3'-dUTP-Überhänge, wodurch eine direkte Ligation des Amplifikats in den Vektor möglich ist. Darüberhinaus besteht bei dem Klonierungssystem die Möglichkeit zur Blau-weiß-Selektion und der Vektor besitzt sowohl ein Ampicillin- als auch Kanamycin-Resistenz-Gen. Die Transformation in chemisch kompetente Nova Blue Singles-Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Sequenzierung der Inserts in pSTBlue-1 wurden die Primer T7 und SP6 eingesetzt.

2.7.3 DNA-Sequenzierung

Alle Plasmide aus den Zwischenklonierungen wurden zur Kontrolle der korrekten Basenabfolge sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1992) von der Firma GATC Biotech (Köln) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Seqman aus dem DNASTAR-Software-Paket.

2.7.4 DNA-Restriktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Restriktionen mit diversen Enzymkombinationen durchgeführt. Im Allgemeinen wurden die Restriktionsenzyme der Firma Fermentas, in Einzelfällen die der Firma Roche eingesetzt.

Bei Ansätzen, die zur Kontrolle der Ligation dienten, erfolgte die Inkubation in der Regel bei 37°C für 2 h. Bei präparativen Ansätzen wurde die Inkubationszeit auf 3 h erhöht, um die größtmögliche Menge an restringierter DNA zu erhalten. Nach Inkubation wurde der Restriktionsansatz mit einem Fünftel des Volumens an GLB versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze richtete sich nach den Herstellervorschriften und folgte grundsätzlich folgendem Schema:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym I	0,4 µl
Restriktionsenzym II	0,4 µl
RNase A	0,1 µl
DNA (alkalische Lyse)	1 µl
H ₂ O dest.	ad 20 µl

2.7.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein schnelles und kostengünstiges Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Zur Auftrennung der für analytische und präparative Zwecke benötigten DNA-Moleküle werden diese in eine Agarosegelmatrix eingebettet und eine elektrische Spannung angelegt. Unter den vorherrschenden basischen Bedingungen bewegen sich die DNA-Fragmente bedingt durch die negative Ladung des DNA-Phosphat-Rückgrats in Richtung Anode. Kleinere Moleküle können sich schneller durch die netzartige Agarosematrix bewegen, wodurch sich die Laufstrecke umgekehrt proportional zur Fragment-Größe verhält. Zusätzlich ist die Laufgeschwindigkeit von weiteren Faktoren, zu denen die Stärke des elektrischen Feldes, Ionenstärke und Porengröße der Agarosematrix zählen, abhängig. Letzterer Faktor kann durch unterschiedliche Konzentrationen des Polysaccharids Agarose variiert werden. Anhand eines mitgeführten Markers, der ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe und Konzentration enthält, kann die Größe der getesteten Fragmente bestimmt und deren Konzentration abgeschätzt werden. Der Nachweis erfolgt optisch über den Farbstoff Ethidiumbromid, der sich durch seine interkalierenden Eigenschaften in den DNA-Doppelstrang einlagert und durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda_A = 254 \text{ nm}$ zur Emission im roten Bereich bei ca. $\lambda_E = 590 \text{ nm}$ angeregt wird.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte abhängig von der jeweiligen Größe der DNA-Fragmente in 1%- oder 2%-igen Agarosegelen mit 1 x TBE-Puffer (Sambrook *et al* 1989). Die angelegte Spannung an der Elektrophoreseapparatur Blue Marine von BioRad betrug 10 V/cm. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an „Gel-loading buffer“ (GLB) versetzt. Als Größenstandard wurden entweder 5 μl Smart-Ladder der Firma Eurogentec oder O'GeneRuler DNA Ladder Low Range der Firma Fermentas aufgetragen. Bei Verwendung des Markers O'GeneRuler DNA Ladder Low Range wurden die Proben mit der entsprechenden Menge des mitgelieferten 6 x Orange Loading Dye-Puffer versetzt. Die Agarosegele wurden 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt und die Fluoreszenz mit Hilfe des ChemiDoc XRS Systems von BioRad dokumentiert.

10 x TBE

Tris-HCl	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

Die pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Probenpuffer (GLB)

Glyzerin	50 % (v/v)
EDTA	125 mM
SDS	1 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)

Ethidiumbromid-Färbebad

Ethidiumbromid	0,4 ml/l
----------------	----------

2.7.6 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktion und Auftrennung in Agarosegelen wurde in der Regel das kommerziell erhältliche E.Z.N.A. Gel Extraktion Kit der Firma Omega biotek verwendet. Dieses Kit ist optimiert für die Reinigung von 50 bp bis 40 kbp großer DNA. Nach der Reinigung ist die DNA frei von Proteinen, Salzen, Agarose und Ethidiumbromid und kann für nachfolgende Ligationen, Sequenzierungen und Restriktionen eingesetzt werden.

Vor Beginn der Isolierung wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem gereinigten Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Isolierung wurde exakt nach den Herstellerangaben durchgeführt. Abschließend erfolgte die Lagerung bei -20°C.

2.7.7 DNA-Ligation

In einem *in vitro* Verfahren können linearisierte DNA-Fragmente mit Hilfe von DNA-Ligasen zusammengefügt werden. Hierbei katalysieren die DNA-Ligasen ATP-abhängig die Verknüpfung der Enden zweier mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnittener DNA-Fragmente. Die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer 3'-Hydroxy-Gruppe führt dabei zur Entstehung eines kovalent geschlossenen DNA-Ringmoleküls.

Nach Restriktion und Reisolation aus dem Agarosegel wurden die DNA-Stücke durch das T4-DNA-Ligase System von Applichem miteinander ligiert. In der Regel betrug das molekulare Verhältnis von linearisiertem Vektor und Insert 1:1. In manchen Fällen musste jedoch das Verhältnis angepasst werden (1:2 oder 1:3). Die Ansätze wurden mit 10 x Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase komplettiert und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Die Zusammensetzung eines Standard-Ligationsansatz sah wie folgt aus:

Vektor-DNA	8,5 µl
Insert-DNA	8,5 µl
10 x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

2.8 Transformationsmethoden

In der vorliegenden Arbeit kamen die nachfolgenden Transformations- bzw. Transfektionsverfahren zum Einsatz, um eine gezielte Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien-, Hefen- und Säugerzellen zu gewährleisten.

2.8.1 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine sehr effektive Methode, um rekombinante Plasmid-DNA in pro- und eukaryotische Zellen einzubringen. Dabei werden mit Hilfe eines Kondensators kurze elektrische Pulse erzeugt, die eine kurzfristige Porenbildung in der Zellmembran hervorrufen, wodurch die exogen applizierte Plasmid-DNA in die Zelle eindringen kann (Calvin und Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988; Hanahan, 1983).

Die Herstellung elektrisch kompetenter Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt. 250 ml LB-Medium wurden 1 %-ig mit einer frischen TOP10 bzw. DH5 α -Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0-1,2 bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Ernten der Kultur durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 8.000 rpm. Danach wurden die Zellen zweimal mit vorgekühltem 10 % Glycerin gewaschen und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde im Rückfluss resuspendiert und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 4°C und 8.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in einem dem Zellpelletvolumen identischen Volumen an 10 % Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in 40 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Da sowohl die verwendeten Bakterienzellen als auch die DNA-Lösung salzfrei sein müssen, erfolgte vor der Elektroporation eine Dialyse des Ligationsansatzes. Dieser Entsalzungsprozess gewährleistet, dass kein Kurzschluss in der Küvette auftritt. Hierbei wurde der Ansatz ca. 50 min auf einem Dialyse-Plättchen der Firma Millipore (0,025 µm) gegen 10 % Glycerin dialysiert. Der salzfreie Ansatz wurde danach in ein 40 µl-Aliquot

kompetenter *E. coli* Zellen gegeben, zusätzlich ein Tropfen steriles 100 % Glycerin hinzugefügt und dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette der Firma BioRad überführt. Die Transformation wurde mit Hilfe des Gene Pulser II von BioRad bei 200 Ω , 25 μ F, und 2,5 kV/cm durchgeführt. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 45 min bei einer Ampicillin- bzw. 60 min bei einer Kanamycin-Selektion. Die Plasmid-Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum-Zusatz bei 37°C über Nacht.

2.8.2 Transformation von Hefen

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte mittels Lithiumacetat-Methode. Dabei befähigen Alkali-Kationen und Carrier-DNA (DNA aus Heringssperma) Hefezellen zu einer effizienteren Aufnahme von Fremd-DNA über die Zelloberfläche (Gietz *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1983; Schiestl und Gietz, 1989). Die eigentliche DNA-Aufnahme wird durch die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) und einen Hitzeschock bei 42°C induziert. Mit der Methode können sowohl rekombinante Plasmide als auch „knock-out“-Kassetten aus linearer dsDNA gezielt in Hefezellen eingeschleust werden.

Bei der Transformation wurden 2 ml einer Übernachtskultur für 3 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 1 ml H₂O dest. gewaschen und in 200 μ l 1 x LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 20 μ l hitzedenaturierter Carrier-DNA (Tabelle 9), 2 μ l Plasmid-DNA sowie 1200 μ l PEG-Lösung hinzugegeben und bei 30°C und 220 rpm für 30 min inkubiert. Nach 15-minütigem Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet zweimal mit 1 x TE-Lösung gewaschen und in 300 μ l 1 x TE-Lösung resuspendiert. Abschließend wurde die Zellen auf entsprechenden d/o-Selektions-Agarplatten ausplattiert und 3-5 d bei 30°C kultiviert.

10 x Lithiumacetat

LiAc

1 M

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit Essigsäure eingestellt.

10 x TE

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM

Der Lösung wurde HCl bis zu einem pH-Wert von 7,5 zugegeben.

1 x LiAc/TE-Lösung

10 x TE	1 Teil
10 x LiAc	1 Teil
H ₂ O dest.	8 Teile

PEG-Lösung

50 % PEG 4000	8 Teile
10 x TE	1 Teil
10 x LiAc	1 Teil

2.8.3 Transfektion von Säugerzellen

Die Plasmid-Transfektion von HeLa-S3- und HEK293T-Zellen wurde mit dem Nanofectin Kit der Firma PAA vorgenommen. Das Kit beinhaltet zwei unterschiedliche Komponenten: positiv geladene Polymere, die DNA binden können und poröse Nanopartikel, in die sich das Polymer einlagert. Dieser Nanopartikel-Komplex wird effektiv von den Säugerzellen aufgenommen und schützt zugleich die gebundene DNA vor der Degradation durch zelluläre Nukleasen. HeLa-S3- und HEK293T-Zellen wurden 24 h vor der eigentlichen Transfektion zu 1×10^5 Zellen in 24 Well-Mikrotiterplatten von Greiner ausgesät. Dabei erfolgte die Transfektion nach Vorschrift des Herstellers. Für die Transfektion von HeLa-S3- bzw. HEK293T-Zellen wurde 1 µg bzw. 0,5 µg DNA eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz zur Zellkultur in einem Endvolumen von 500 µl gegeben. Die Zellen wurden bis zur Ernte bzw. Toxizitätsmessung bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.9 Probenvorbereitung

2.9.1 Zellaufschluss und -extraktzubereitung

2.9.1.1 Bakterien

Die rekombinante Expression der verschiedenen Ricin-Varianten erfolgte im *E. coli* Expressionssystem. In diesem System ist jedoch nur eine intrazelluläre Expression von rekombinanten Proteinen möglich, wodurch es nötig war, die Bakterienzellen für die nachfolgenden Reinigungsschritte bzw. für den Expressionsnachweis aufzuschließen. Dazu wurde die Ultraschall-Methode verwendet, die auf dem Prinzip der Kavitation basiert. Hierbei werden durch das erzeugte Ultraschallfeld in der Flüssigkeit Schallwellen erzeugt. Diese verursachen die Bildung und Implosion von Wasserdampfblasen, wodurch die Zellen durch die dabei entstehenden hohen Druck- und Temperaturspitzen zerstört werden.

Der Ultraschallaufschluss erfolgte mittels Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator von MSE. Hierzu wurden 500-1000 ml Bakterienkultur 10 min bei 4°C und 8.000 rpm abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 5 ml Binding-Puffer mit EDTA-freiem Protease-Inhibitor (20 µl/ml, Punkt 10.2.2.1) von Roche resuspendiert und in ein Ultraschall-Glasröhrchen überführt. Die Probe wurde während des Aufschlusses auf Eis gekühlt. Der Aufschluss beinhaltete 5 Zyklen mit jeweils 15 s Beschallung bei einer Amplitude von 20 Microns und einer darauffolgenden Pause von 30 s auf Eis. Nachfolgend wurde die Suspension in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 15.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen und die Überstände mittels Rotilabo[®]-Spritzenfiltern von Roth (0,22 µm Durchmesser) von restlichen Zellbestandteilen befreit. Anschließend wurden die Überstände zur weiteren Reinigung mittels Ni²⁺-NTA Chromatographie eingesetzt (Punkt 2.10.1). Zum Nachweis der Expression wurde sowohl der Überstand mit den löslichen sowie das Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen zur Western-Analyse verwendet. Dazu wurde das Pellet zweimal in H₂O dest. gewaschen, im Rückfluss resuspendiert, die Suspension im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Bindungspuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt.

2.9.1.2 Säugerzellen

Der Aufschluss von Säugerzellen verlief nach folgendem Schema. Zur Zellernte wurden die in den entsprechenden Mikrotiterplatten inkubierten Zellen in einer Zentrifuge Allegra X-22R von Beckman Coulter mit einem speziellen Zentrifugeneinsatz (S2096) für 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu den Verlust von abgelösten Zellen zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, durch einen erneuten Zentrifugationsschritt abzentrifugiert und durch 1 x Trypsin/EDTA-Behandlung über 3 min bei 37°C abgelöst. Nach Inhibierung von Trypsin durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurden die Zellen gezählt und anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 3.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in RIPA-Puffer und SDS-Probenpuffer aufgenommen, resuspendiert und über 5 min bei 95°C gekocht. In einem abschließenden Schritt wurde mit Hilfe von Glasperlen und einem 10-minütigen Vortexschritt bei mittlerer Stufe die DNA fragmentiert, wodurch die Probe bei der späteren SDS-PAGE besser aufgetragen werden konnte. Die Volumina an RIPA-Puffer und Probenpuffer wurden so gewählt, dass jeder Ansatz eine definierte Anzahl an Zellen (2×10^5 Zellen pro 30 µl) enthielt. Dies garantierte eine ungefähr gleiche Proteinmenge der einzelnen Proben innerhalb einer Versuchsansatzes.

RIPA-Puffer

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
IGEPAL	1 %
Na-Deoxycholat	1 %
SDS	0,1 %

2.9.2 Proteinfällung

2.9.2.1 Aceton-Fällung

Die Konzentration von Proteinen aus Lösungen erfolgte mittels Aceton-Fällung. Dabei wurde 1 Teil der zu fällenden, wässrigen Probe mit 4 Teilen eiskaltem Aceton versetzt, gemischt und bei -20°C über Nacht gefällt. Die gefällten Proteine wurden 30 min bei 4°C und 15.000 rpm abzentrifugiert und im Verhältnis 1:1 in H₂O dest. und 2 x SDS-Probenpuffer gelöst und 5 min bei 95°C aufgekocht, bevor sie zur SDS-PAGE eingesetzt wurden.

2.9.2.2 TCA-Fällung

Eine alternative Möglichkeit stellt die Fällung von Proteinen mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) dar. Hierzu wurde die zu fällende Probe mit einem 1/100 Volumen einer 2 %-igen Natriumdeoxycholat-Lösung komplementiert, die Probe gevortext und anschließend 30 min bei 4°C inkubiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 100 % TCA bei -20°C über Nacht. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15.000 rpm wurden der Überstand verworfen, das entstandene Pellet zweimal mit 100 % Aceton gewaschen, getrocknet, mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert.

2.10 Proteinreinigung

Die weiterführenden Beschreibungen der verschiedenen Reinigungsprotokolle beginnen mit dem sterilfiltrierten Überstand, der nach Zellaufschluss und Zentrifugation erhalten wurde. Die Reinigungen wurden entweder mit Hilfe des Äkta Purifier von GE Healthcare oder einem Reinigungssystem von Pharmacia, bestehend aus einer Pumpe (LKB Pump P1), einem Detektor (Programmer GP-250 Plus) und einem Schreiber (LKB-REC102), durchgeführt. Bei der Reinigung mittels Äkta Purifier wurden Fraktionen mit Hilfe des Fraktionssammlers Frac950 von GE Healthcare gesammelt.

2.10.1 Ni²⁺-NTA Chromatographie

Zur Reinigung His-getaggtter Proteine wurde die Ni²⁺-NTA Chromatographie eingesetzt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der starken Affinität von Histidin zu Metallionen wie z. B. Ni²⁺. Die Bindung der getaggtten Proteine erfolgt dabei an Säulen, die Nickelionen über einen Nitrolessigsäure-Rest (NTA) gebunden haben. Hierbei kann das gebundene Nickel im Austausch gegen Wasser mit zwei His-Resten des Proteins interagieren. Im Allgemeinen binden diese Fusionsproteine wesentlich stärker an das Säulenmaterial als ungetaggte Proteine. Zur abschließenden Elution der Proteine wird in der Regel Imidazol verwendet (Crowe *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden die kommerziell erhältlichen 5 ml bzw. 1 ml HisTrapTM HP Säulen von GE Healthcare eingesetzt. Die Säule wurde zu Beginn mit 5 Volumen Bindepuffer äquilibriert und nach dem Auftragen der Probe mit 5-10 Volumen Bindepuffer gespült. Der Elutionsschritt erfolgte mit 100 % Elutionspuffer. Die Eluatfraktion wurde in einem 15 ml Falcon aufgefangen und bis zur Umpufferung auf Eis gelagert.

Bindungspuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt.

Elutionspuffer

NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,2 eingestellt.

2.10.2 Umpufferung

Zur weiteren Analyse der Toxinvarianten musste das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol aus den Eluatn entfernt werden, da dieses Salz bereits in moderater Konzentration die Bestimmung der Proteinkonzentration stört. Hierzu kam eine mit den entsprechenden Zielpuffern 1 x PBS Dulbecco pH 7,4 (für Säugerexperimente) bzw. Inkubationspuffer pH 4,7 (für Hefeexperimente) äquilibrierte Gelfiltrationssäule von Pharmacia (Phenyl-Sepharose, XK 26/10 HiLoad™, beladenen mit 60 ml Sepharose G 25) zum Einsatz. Die Umpufferung und die anschließende Elution fanden auch in den oben erwähnten Puffern statt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Vivaspın20-Ultrafiltrationseinheiten von Sartorius (Ausschlussgrenze 30 kDa) bei 8.000 rpm auf ein Endvolumen von 5 ml eingengt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C auf Eis.

Inkubationspuffer

Tris-HCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM
Glukose	10 mM
Sorbitol	0,8 M

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 4,7 eingestellt.

1 x PBS Dulbecco

Dabei handelt es sich um eine fertige PBS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} der Firma Biochrom (Tabelle 9).

2.11 Proteinbiochemische Methoden

Um die Expression der einzelnen in dieser Arbeit hergestellten Toxininfusionen nachzuweisen und näher zu verifizieren, wurden entsprechende Methoden zur Detektion von Proteinen angewendet. Diese umfassten Methoden wie SDS-PAGE, Western-Analyse und Coomassie-Färbung.

2.11.1 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA Protein Assay Kits von Pierce. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Form der Lowry-Methode (Hartree, 1972), die auf dem kolorimetrischen Nachweis eines violetten Bicinchoninsäure (BCA)/ Cu^{+} -Farbkomplexes bei 562 nm beruht. Dieser entsteht durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf die in der Lösung vorhandenen Cu^{2+} -Ionen und der anschließenden Reaktion mit Bicinchoninsäure (Redinbaugh und Turley, 1986; Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Die Konzentrationsbestimmung verlief exakt nach den Herstellerangaben. Als Eichgerade wurden Proben mit bekannten Konzentrationen (25 $\mu\text{g/ml}$ bis 2000 $\mu\text{g/m}$) von Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt. Sowohl für die Eichstandards als auch die Proben wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Nach der Probenvorbereitung wurden die zu testenden Proben in 96 Well-Mikrotiterplatten von Nunc für 30 min bei 37°C im Microplate Reader 680 XR von BioRad inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm automatisch bestimmt.

2.11.2 SDS-PAGE

Im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese lassen sich mit dem erstmals von Shapiro *et al.* (1967) beschriebenen Verfahren Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld auftrennen (Shapiro *et al.*, 1967). Dabei erfolgt die Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen, die durch die Zugabe des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht wird. Dadurch werden fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein durch das im Gel und Probenpuffer enthaltene Detergenz zerstört. Zusätzlich entstehen negative geladene Protein-SDS-Komplexe, die ein konstantes Masse zu

Ladungsverhältnis aufweisen, was auf die Anlagerung von SDS im Verhältnis 1,4:1 an die hydrophoben Aminosäurereste der Proteine zurückzuführen ist. Unter diesen Bedingungen hängt demnach die Wanderung der Proteine zur Anode ausschließlich von ihrer molekularen Masse ab. Zur Reduzierung von Disulfidbrücken können zusätzlich noch denaturierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol zugegeben werden.

Das für die Auftrennung des Proteingemischs eingesetzte Polyacrylamidgel entsteht durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Dies führt zu einer Quervernetzung der Polyacrylamidketten, wobei die Porengröße des Gels durch das Verhältnis an eingesetztem Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt werden kann. Das zusätzlich zugegebene Ammoniumpersulfat (APS) dient dabei als Radikalstarter, während Tetramethylethyldiamin (TEMED) eine wichtige Funktion als Reaktionskatalysator übernimmt. Als Größenstandard wird ein Marker, der ein Gemisch aus Proteinen bekannten Molekulargewichts darstellt, mit aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Verbesserung der Bandenauftrennung ein diskontinuierliches System eingesetzt, das aus 12,5 %-igen Trenn- und Sammelgelen bestand. Dabei erfolgt im ersten Schritt eine Konzentrierung des Proteingemischs im Sammelgel; im zweiten Schritt wird eine Auftrennung der einzelnen Proteine durch das engporige Trenngel erreicht.

Ansatz für 2 Trenngele:

Rotiphorese Gel 30	5,88 ml
Tris-HCl/SDS pH 8,45	5 ml
H ₂ O dest.	2,3 ml
87 % Glycerin	1,6 ml
TEMED	25 μ l
APS 10 %	80 μ l

Ansatz für 2 Sammelgele:

Rotiphorese Gel 30	1,62 ml
Tris-HCl/SDS pH 8,45	3,1 ml
H ₂ O dest.	7,78 ml
TEMED	25 μ l
APS 10 %	80 μ l

In der Regel wurden die Proben vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit denaturierendem 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Bei nativen Bedingungen wurden die Proben mit nicht-reduzierendem Puffer behandelt und ohne

zusätzliches Kochen aufgetragen. Als Proteinlängenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im Mini-Protean II-Elektrophorese-System von BioRad bei einer Spannung von 80-120 V. Der Proteinnachweis erfolgte entweder mittels Western-Analyse oder Coomassie-Färbung.

2 x SDS-Probenpuffer

SDS	4 %
EDTA	4 mM
Glyzerin	20 %
Bromphenolblau	0,01 %
Phenolrot	0,01 %

in 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH6,8

Der reduzierende Probenpuffer enthielt zusätzlich 5 % β -Mercaptoethanol.

Tris-HCl/SDS

Tris-HCl	3 M
SDS	0,5 %

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,45 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert.

5 x Kathodenpuffer

Tris-HCl	500 mM
Tricin	500 mM
SDS	0,5 %

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

5 x Anodenpuffer

Tris-HCl	1 M
----------	-----

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,9 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert.

2.11.3 Western-Analyse

Die Western-Analyse ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteine nach erfolgter SDS-PAGE (Punkt 2.11.2) auf einer PVDF-Membran immobilisiert, wodurch nachfolgend ein Nachweis mittels Protein-spezifischer Antikörper (AK) erfolgen kann (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1992). Das Prinzip des sogenannten „Elektroblottings“ beruht dabei auf der Wanderung der negativ geladenen Proteine im angelegten elektrischen Feld in Richtung Trägermembran. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membran haften, ohne eine Veränderung des bei der elektrophoretischen Trennung entstandenen Bandenmusters zu verursachen. Die Trägermembran wird vor der Immunodetektion mit entsprechenden Blocking-Puffern behandelt, um freie Antikörper-Bindungsstellen durch Proteine wie z. B. BSA oder Casein zu blockieren. Anschließend können die gewünschten Proteine auf der Membran durch den Einsatz eines primären Antikörpers, der das zu detektierende Protein erkennt, und eines sekundären Antikörpers, der an spezifische Epitope des primären Antikörpers bindet, nachgewiesen werden. Im Allgemeinen ist der sekundäre mit einem biologisch aktiven Enzym gekoppelt, welches durch die Zugabe eines geeigneten Substrats nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden sekundären Antikörper eingesetzt, die mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt waren. Nach Applikation des Substrats SuperSignal® West Dura von Pierce kommt es dabei zu einer Chemilumineszenz-Reaktion.

2.11.3.1 „Semi Dry“ Blotting

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteintransfer mittels „Semi Dry“ Blotting im Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell der Firma BioRad durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine PVDF-Membran (6,5 cm x 9 cm) von Roche mit 100 % Methanol benetzt und in Transferpuffer 10 min aquilibriert. Zusätzlich wurden die zwei Whatman-Blottingpapiere (6,5 x 9 cm) und die fertigen SDS-Gele in Transferpuffer äquilibriert. Der Zusammenbau der Elektrophorese-Vorrichtung erfolgte nach folgendem Prinzip. Die SDS-Gele wurden auf die äquilibrierte PVDF-Membranen gelegt und zwischen den beiden halbtrockenen Whatman-Blottingpapieren in die horizontale Blotting-Apparatur eingespannt. Bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA pro SDS-Gel wurden die Proteine innerhalb von 90 min aus der Gelmatrix auf die Membran transferiert.

Transferpuffer

Tris-HCl	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 %
Methanol	20 %

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

2.11.3.2 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in Blockingpuffer 2 h bei 20°C bzw. über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Der dabei verwendete Puffer richtete sich nach den Herstellerangaben des jeweils eingesetzten primären Antikörpers. Die Membranen wurden anschließend mit in 10 ml Blockingpuffer gelöstem primären AK in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 7) für 1 h bei 20°C inkubiert. Nach Inkubation im Hybridizer HB-1000 Hybridizer der Firma UVP Laboratory Products wurde die Membran dreimal für 8 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der in 10 ml Blockingpuffer gelöste sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 7) zugegeben und die Membran wiederum für 1 h bei 20°C inkubiert. Die abschließenden drei 8-minütigen Waschschrte in Waschpuffer dienten zur Entfernung von ungebundenen AK. Die Entwicklung der Membran erfolgte durch die Applikation des Chemilumineszenz-Substrats von Pierce nach den Herstellerangaben. Die entstandene Lumineszenz wurde im ChemiDoc XRS System von BioRad detektiert. In Allgemeinen wurde hierzu eine Belichtungszeit von 5 bis 10 min ausgewählt.

Waschpuffer

Tween 20	0,05 %
10 x TBS	10 %

10 x TBS

Tris-HCl	1 M
NaCl	1 M

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Blockingpuffer I

Magermilch	5 %
------------	-----

Blockingpuffer II

BSA	3 %
-----	-----

Beide Blocking-Puffer wurden in Waschpuffer gelöst.

2.11.4 Coomassie Färbung

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde mittels Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierbei wird der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue eingesetzt. Aufgrund des sauren Milieus bindet dieser an basische und aromatische Seitenketten von Proteinen und färbt so unspezifisch alle Proteine. Die Polyacrylamidmatrix des Geles selbst wird dagegen schwächer angefärbt, wodurch Proteine nach der Entfärbung als blaue Banden im Gel sichtbar werden. Die Nachweisgrenze des hier verwendeten Protokolls liegt bei etwa 100 ng Protein (Schagger *et al.*, 1988). Es besteht aber auch die Möglichkeit, diese durch verschiedenen Modifikationen auf bis zu 1 ng Protein zu verbessern (Wang *et al.*, 2007b).

Die Trenngele der Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter SDS-PAGE in Färbelösung 2 h bei 20°C auf dem Taumler inkubiert. Alternativ dazu kann die Färbung durch 30 s Erhitzen in der Mikrowelle beschleunigt werden. Nach dem erfolgten Färbungsschritt wurde die Färbelösung entfernt und das Gel in Entfärberlösung für mehrere Stunden bei 20°C auf dem Taumler inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Entfärberlösung mehrmals erneuert, bis die Proteinbanden erkennbar waren und der Hintergrund der Polyacrylamidmatrix klar erschien. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels eines handelsüblichen Scanners von Canon.

Färbelösung

Coomassie Brillant Blue R	0,1 %
Methanol	30 %
Essigsäure	10 %

Entfärberlösung

Methanol	30 %
Essigsäure	10 %

2.12 Experimente zum ER-Import von RTA in Hefen

2.12.1 Radioaktive Markierung („pulse labeling“)

Alternativ zur Western-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit die *in vivo* Expression von RTA in Hefen mit Hilfe der „pulse labeling“-Methode detektiert. Dieses deutlich sensitivere, biochemische Verfahren beruht auf der Markierung der Proteine mit Radioisotopen und der anschließenden Immunopräzipitation des gewünschten Proteins mittels spezifischer Antikörper. Die experimentelle Durchführung erfolgte dabei analog zu dem in der Dissertation von Schnöder (2009) beschriebenen Protokoll. Als Größenstandard diente sowohl der [¹⁴C]-markierte protein molecular weight marker CFA75G der Firma GE Healthcare als auch der protein molecular weight marker NEC-811 von PerkinElmer. Die abschließende Detektion des radioaktiven Proteins erfolgte mittels direkter Autoradiographie oder Phosphorimaging.

2.12.2 Direkte Autoradiographie

Die direkte Autoradiographie erfolgte nach dem in der Dissertation von Schnöder (2009) beschriebenen Protokoll.

2.12.3 Phosphorimaging

Eine weitere Möglichkeit zur Visualisierung der aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine ist das Phosphorimaging. Hierzu wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese 15 min mit Fixierlösung behandelt und danach 30 min in Neutralisationslösung inkubiert, bevor die SDS-Gele unter Vakuum 1 h bei 70°C im Geltrockner Unigeldryer 3543D von MBI auf einem Filterpapier (11 x 14 cm) von Whatman getrocknet wurden. Das getrocknete Gel wurde nachfolgend in einer Exponierkassette Exposer Cassette von GE Healthcare bei RT über den Zeitraum von 24 h bis 120 h exponiert. Die Detektion erfolgte mittels Phosphorimaging im Typhoon Trio der Firma GE Healthcare. Zur Auswertung der Gelbilder wurde das Programm ImageQuant TL verwendet.

Fixierlösung

Essigsäure	10 %
Methanol	40 %
Glyzerin	2 %

Neutralisationslösung

Methanol	50 %
Glyzerin	2 %

2.12.4 Deglykosylierung mit EndoH

Die für die Deglykosylierung eingesetzte Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (EndoH) spaltet spezifisch mannosereiche Glykosilreste von Proteinen zwischen der ersten und der zweiten N-Acetylglucosamin-Einheit der Core-Glykosylierung (Maley *et al.*, 1989). Mit diesem Verfahren kann indirekt der Import eines Proteins in das Endoplasmatische Retikulum untersucht werden, da Proteine erst nach erfolgtem ER-Import die abspaltbare Core-Struktur aufweisen. Dabei wird die Glykosylierung und somit der ER-Import durch einen Shift der Proteinbandengröße im SDS-Gel nachgewiesen. Die durch „pulse labeling“ radioaktiv markierten Proben wurden nach der Immunpräzipitation und den darauffolgenden Waschschritten (Punkt 2.12.1 in zwei gleichgroße Aliquots aufgeteilt und je ein Ansatz mit bzw. ohne EndoH der Firma NEB nach Herstellerangaben behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurden beide Ansätze mit reduzierendem 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und zur SDS-PAGE eingesetzt. Der Nachweis erfolgte entweder über direkte Autoradiographie oder Phosphorimaging.

2.12.5 Proteasom-Inhibition mit MG132

Zur Inhibition des Proteasoms während der Pulsemarkierung wurde der Inhibitor MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) von Calbiochem eingesetzt. Diese hochpotente, zellpermeable Substanz verringert die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen in Säuger- und permeablen Hefezellen, wodurch eine Proteinakkumulation stattfindet. Dadurch können auch schwach exprimierte und schnell degradierte Proteine besser nachgewiesen werden.

Die Inhibition von Hefezellen konnte nur im Deletionsstamm *Δerg6* (Tabelle 3) durchgeführt werden, da dieser im Vergleich zu Wildtyp-Hefestämmen permeabel für MG-132 ist. Hierzu wurde MG-132 den entsprechenden Hefezellen 90 min vor der eigentlichen Pulsmarkierung zugegeben. Der Inhibitor wurde in einer Endkonzentration von 100 μ M dem Medium hinzugefügt und der Ansatz bei 30°C und 220 rpm im Dunkeln weiterkultiviert. Die experimentelle Durchführung vor und nach der Inhibitorzugabe verliefen analog zu Punkt 2.12.1.

2.13 *In vitro* Synthese von Proteinen

Die *in vitro* Transkription der Plasmide pGEM-RTA^{E177D}, pGEM-K28prepro_{SS}-RTA^{E177D} und pGEM-PL_{SS}-RTA^{E177D} (Tabelle 6) sowie die anschließende *in vitro* Translation erfolgte anhand des Protokolls von Schnöder (2009). Nach erfolgter Translation wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, im Phosphorimager Typhoon Trio analysiert und mit Hilfe der ImageQuant TL Software ausgewertet.

2.14 Toxizitätsbestimmungen bei Hefen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Nachweismethoden angewendet, um das Wachstum von Hefen bzw. Hefemutanten nach intrazellulärer Expression bzw. extrazellulärer Applikation von verschiedenen RTA-Varianten zu analysieren. Die ersten Methoden wurden dabei nur mit intakten Hefezellen durchgeführt, während in den weiteren Verfahren sogenannte Sphäroplasten (Punkt 2.14.2), zellwandfreie Hefezellen, sowie intakte Zellen eingesetzt wurden.

2.14.1 Wachstumstest

Die Quantifizierung der *in vivo* Toxizität von intrazellulär exprimierten RTA-Varianten wurde mittels des nachfolgend beschriebenen Wachstumstests durchgeführt. Durch diese Methode können Proteine identifiziert werden, die am Wirkmechanismus eines Toxins beteiligt sind. Hierzu wurden die jeweiligen transformierten Hefen bzw. Hefemutanten über Nacht in 5 ml d/o-Raffinose Medium bei 30°C angezogen, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei 9.000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 50 µl d/o-Raffinose Medium resuspendiert und eine serielle Verdünnungsreihe (10^2 - 10^7) hergestellt. Anschließend wurden 5 µl der jeweiligen Verdünnungen sowohl auf einer Glukose-Platte (reprimierende Bedingungen) als auch auf einer Galaktose-Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft. Die Inkubation erfolgte 5 d bei 30°C. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen, die den entsprechenden Leervektor enthielten, mitgeführt.

2.14.2 Sphäroplastierung von Hefezellen

Die Sphäroplastierung von Hefezellen stellt eine Methode zur Gewinnung von zellwandlosen Hefezellen mittels Zymolyase dar. Dieses aus dem Kulturüberstand von *Arthrobacter luteus* isolierte Enzym besitzt eine starke lytische Aktivität gegenüber der Hefezellwand, wobei es

spezifisch die Hydrolyse von β -1,3-glykosidischen Bindungen linearer Glukose-Polymere katalysiert. Die Durchführung findet dabei in osmotisch stabilisiertem Medium statt, um die Integrität der Sphäroplasten zu gewährleisten. Die Sphäroplastierung verlief nach einem modifizierten Protokoll von Zhu (1989) (Zhu und Bussey, 1989).

Zur Präparation der Sphäroplasten wurden Hefezellen im entsprechenden Flüssigmedium bis zur späten exponentiellen Phase ($4-6 \times 10^7$ Zellen/ml) kultiviert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und 1×10^9 Zellen für 10 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach zweimal mit sterilem H_2O dest. gewaschen und in 100 ml Sphäroplastierungspuffer aufgenommen (1×10^7 Zellen/ml). Der Ansatz wurde anschließend mit 200 μ l DTT und 20 mg Zymolyase 20 T der Firma Seikagaku Corporation komplementiert und 75-120 min bei 30°C und 110 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 4°C und 2.000 rpm pelletiert und zweimal in sterilem Inkubationspuffer (Punkt 2.10.2) im Fall von Punkt 2.14.3 und Punkt 2.14.4 bzw. stabilisiertem Leu-d/o-Raffinose Medium im Fall von Punkt 2.14.5 gewaschen, bevor die Zellen darin resuspendiert wurden. Die Überprüfung der Sphäroplastierungseffizienz erfolgte durch das Ausplattieren von in H_2O dest. suspendieren und im Anschluss 30 s gevortexten Sphäroplasten auf entsprechenden Agarplatten (YPD- bzw. Leu-d/o-Glukose-Platten).

stabilisiertes d/o-Medium

Das Medium setzt sich aus den Komponenten, die in Punkt 2.4.2 beschrieben sind, zusammen. Zusätzlich wurde der Lösung 0,8 M Sorbitol hinzugefügt.

2.14.3 Respirationstest

Diese von John *et al.* (2003) beschriebene *in vivo* Methode zur indirekten Bestimmung der Toxizität von Substanzen und Toxinen auf Mikroorganismen bzw. Säugerzellen beruht auf der Messung der gelösten Sauerstoffkonzentration des Mediums und deren Veränderung über die Zeit. Die Sauerstoffkonzentration lässt direkt Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen und damit auf ihre Vitalität zu. Um diese Konzentrationsänderungen zu messen, wurden 96 Well-Mikrotiterplatten der Firma PreSens verwendet. Diese sogenannten Oxoplates enthalten jeweils zwei immobilisierte Fluorophore; das Sauerstoff-sensitive (540 nm/650 nm) dient dabei als Indikator für den gelösten Sauerstoff, wohingegen das Sauerstoff-unabhängige (540 nm/590 nm) als interne Standard fungiert. Durch diese Referenz können Fluktuationen in der Lichtintensität oder Detektorsensitivität eliminiert werden. Die

im Fluoreszenzreader von Fluoroskan Ascent Labsystems gemessene Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zur gelösten Sauerstoffmenge des Mediums.

Wildtyp-Hefezellen und Hefemutanten wurden in YPD-Medium bis zur späten exponentiellen Phase angezogen und mit Hilfe des beschriebenen Protokolls sphäroplastierte (Punkt 2.14.2). Danach wurden $1,5 \times 10^7$ in 100 μ l Inkubationspuffer gelöste Sphäroplasten in die 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen RTA-Varianten zugegeben (200 μ l Endvolumen pro Well). Zusätzlich wurde bei jeder Messung eine Zwei-Punkt Kalibrierung durchgeführt. Als Positivkontrolle (k_{100} -Wert) wurde mit Sauerstoff gesättigtes H_2O dest. und als Negativkontrolle (k_0 -Wert) mit 0,1 % Na_2SO_3 versetztes H_2O dest. verwendet. Die Sauerstoffkonzentration der einzelnen Proben wurde alle 20 min über einen Zeitverlauf von 16 h ermittelt. Dies erfolgte bei 30°C und 120 rpm mit einem Schütteldurchmesser von 1 mm. Für jede Probe wurden drei parallele Ansätze gemessen, von denen dann ein Mittelwert gebildet wurde.

Die Berechnung des Sauerstoffpartialdrucks wurde mit den nachfolgenden zwei Formeln durchgeführt und der Zeitverlauf graphisch dargestellt.

$$I_R = \frac{I_{ind}}{I_{ref}} \quad (1) \quad pO_2 = 100 \frac{\left(\frac{k_0}{I_R} - 1\right)}{\left(\frac{k_0}{k_{100}} - 1\right)} \quad (2)$$

2.14.4 Toxizitätstest mittels Propidiumiodid

Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) wirkt wie Ethidiumbromid als Nukleinsäureinterkalator, der sich zwischen die Basen von DNA bzw. RNA einlagert. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 488 nm zu 535 nm und des Emissionsmaximums von 590 nm zu 635 nm. Aufgrund der Eigenschaft von PI nur durch perforierte Membranen toter und nicht durch intakte Membranen lebender Zellen zu diffundieren, wird der Farbstoff häufig zur Detektion von nekrotischen Zellen bei der Durchflusszytometrie eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der indirekte Nachweis der RTA-Toxizität auf Hefen über die Messung der PI-Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Fluoreszenzreaders PARADIGM von Beckman Coulter.

Hefenzellen bzw. Hefemutanten wurden bis zur späten exponentiellen Phase in YPD-Medium angezogen und anschließend sphäroplastierte (Punkt 2.14.2). $1,5 \times 10^7$ Sphäroplasten wurden in schwarzen 96 Well-Mikrotiterplatten von Nunc über 24 h bei 30°C und 115 rpm mit den entsprechenden RTA-Varianten kultiviert, danach mit 2,5 μ l einer steriltrierten 1 μ g/ml

PI-Stammlösung 3 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend die Fluoreszenz im Fluoreszenzreader bei einer Absorptionswellenlänge von 535 +/- 25 nm und Emissionswellenlänge von 635 +/- 25 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Hefezellen (20 min bei 95°C) eingesetzt. Dabei wurden für jede Probe fünf parallele Ansätze gemessen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Die Berechnung der relativen Fluoreszenz erfolgte mit der folgenden Formel.

$$\text{Fluoreszenz} = \frac{(\text{Emission Probe} - \text{Emission Referenz})}{(\text{Emission Positivkontrolle} - \text{Emission Referenz})} \times 100$$

2.14.5 Mikrotiterplatten-GFP-Fluoreszenz-System

Eine alternative Methode zur Untersuchung der *in vivo* Toxizität der unterschiedlichen RTA-Varianten in Hefezellen stellt das Mikrotiterplatten-GFP-Fluoreszenz-System dar. Um den Einfluss von extrazellulär applizierten RTA-Varianten auf das Zellwachstum und -überleben von Wildtyp-Hefen und deren Deletionsmutanten zu testen, wurde indirekt die *in vivo* Translation des Reporterproteins GFP („green fluorescent protein“) mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Dazu wurde die zu untersuchenden Hefen mit dem Reporterkonstrukt pRS315-K28_{SS}-GFP (Tabelle 6) transformiert. Nach zeitgleicher Induktion der GFP-Expression und Applikation der RTA-Varianten wurde die Änderung der Fluoreszenz im Verlauf der Zeit bestimmt. Dabei kann die Hemmung der GFP-Translation indirekt anhand der Fluoreszenzintensitätsänderung detektiert werden. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzreader Fluoroskan Ascent der Firma Thermo Labsystems mit dem Filterpaar 485 nm/535 nm.

Zur Versuchsdurchführung wurden 25 ml Leu-d/o-Raffinose-Medium 2 %-ig mit einer frischen Übernachtskultur der entsprechenden transformierten Hefe beimpft und bei 30°C und 220 rpm über Nacht kultiviert. Dann wurde die Zellzahl bestimmt, 5 x 10⁸ Zellen 10 min bei 8.000 rpm geerntet und die Zellen anschließend in einem 50 ml Ansatz sphäroplastiert (Punkt 2.14.2). Die Zellen wurden nach der Sphäroplastierung zweimal 10 min bei 2.000 rpm in stabilisiertem Leu-d/o-Medium gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet in stabilisiertem Leu-d/o-Medium suspendiert, so dass eine Zellzahl von 1 x 10⁸ Sphäroplasten pro ml erreicht wurde. Im Fall von K28 und K1 wurden die Zellen nach der Sphäroplastierung mit stabilisiertem Leu-d/o-Medium (pH = 4,7) gewaschen und aufgenommen. Die Einstellung des pH-Wert erfolgte mittels McIlvaine-Puffer (Gießelmann, 2011). Zur Fluoreszenzmessung wurde in jedes Well einer 96 Well-Mikrotiterplatten von Nunc 200 µl Zellsuspension

gegeben. Zusätzlich wurde in jedes Well 30 µl stabilisierte 30 %-ige Galaktose-Stammlösung und die verschiedenen Konzentrationen der stabilisierten Toxinvarianten hinzugegeben, so dass ein Endvolumen von 300 µl entstand. Die Messung der Proben verlief über 20 h bei 30°C und 120 rpm mit einem Schütteldurchmesser von 1 mm.

2.15 Toxizitätsbestimmung bei Säugerzellen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion der toxischen Wirkung der hergestellten Toxinvarianten auf Säugerzellen mit Hilfe der im nachfolgenden aufgeführten Methoden.

2.15.1 Trypanblau-Vitalitätstest

Bei dem Verfahren wird der Farbstoff Trypanblau verwendet, bei dem es sich um einen Diazofarbstoff handelt. Dieser zur Vitalitätsbestimmung eingesetzte Stoff ist nicht in der Lage in lebende Zellen einzudringen, während abgetötete Zellen die Substanz aufnehmen und angefärbt werden. Die Auswertung der Proben muss aufgrund der starken Toxizität von Trypanblau unmittelbar danach erfolgen.

Für den Vitalitätstest wurden 1×10^5 Zellen pro Well in 24 Well Mikrotiterplatten ausgesät und in DMEM-Medium, welches mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin komplementiert wurde, für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Endvolumen von 500 µl kultiviert. Nach Zugabe der zu testenden Toxin- und Kontrollkonzentrate wurden die Zellen zusätzlich für 24 h bzw. 48 h unter den zuvor erwähnten Bedingungen inkubiert. Zur fotografischen Dokumentation der Proben wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten das Medium entfernt, die Zellen für 5 min in 0,4 % Trypanblau der Firma Sigma-Aldrich angefärbt und anschließend mit 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop unter Standardbedingungen analysiert. Zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses von lebenden und toten Zellen wurden die Proben nach 24 h bzw. 48 h geerntet. Dazu wurden die Medienüberstände und die abtrypsinierten Zellen gepoolt, 3 min bei 2.000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 1 x PBS gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und 100 µl 0,4 % Trypanblau zugegeben. Die Auszählung erfolgte nach 3 min im automatisierten Zellzähler Countless[®] Automated Cell Counter von Invitrogen unter Verwendung der dazugehörigen Kammer-Objektträger Countless[®] Cell Counting Chamber Slide. Dabei wurden für jede Probe zwei parallele Ansätze gemessen, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

2.15.2 XTT basierter Vitalitätstest

Die Bestimmung der Zellvitalität von Säugerzellen erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *In vitro* Toxicology Assay Kit, XTT based von Sigma-Aldrich. Dabei beruht das Prinzip dieser etablierten Methode auf der Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität in vitalen Zellen. Die Schlüsselkomponente stellt das wasserlösliche Tetrazoliumsalz XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxy-anilide inner salt) dar, welches in Anwesenheit von aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen durch die Reduzierung des Tetrazolium-Rings zu einem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan-Derivat umgewandelt wird. Die Absorption des Derivats kann anschließend bei 450 nm spektralphotometrisch gemessen werden. Eine Veränderung der Zellvitalität bedingt durch eine toxische Wirkung der Probe kann somit anhand der Menge des gebildeten Formazans bestimmt werden.

Zur Vitalitätsmessung wurden 1×10^5 Zellen pro Well in 24 Well Mikrotiterplatten ausgesät und in DMEM Medium, das 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthält, für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Endvolumen von 500 µl kultiviert. Anschließend wurden das Medium abgenommen, 400 µl des neuen Mediums und 100 µl der zu testenden Proben zugegeben und die Zellen für weitere 24 h bzw. 48 h im Inkubator inkubiert. Danach wurden die Ansätze zweimal mit 1 x PBS gewaschen, vor jedem Waschschrift bei 1.600 rpm abzentrifugiert und schließlich neues Phenolrot- und FKS-freies DMEM-Medium in die Wells gegeben. Die Behandlung mit XTT verlief analog zu den Herstellerangaben. Nach 3-4 h Inkubationszeit wurde die Überstände der Proben mit 1 x PBS 1/10 verdünnt und die Absorption mit einem Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro von Amershan Biosciences bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Jede Probe wurde parallel dreifach gemessen. Die relative Vitalität wurde anhand folgender Formel errechnet.

$$\text{Vitalität} = \frac{(\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Medium}})}{(\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Medium}})} \times 100$$

2.15.3 WST-1-basierter Vitalitätstest

Beim WST-1-basierten Vitalitätstest wird wie beim XTT-basierten Vitalitätstest ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol-5-yl]-1,3-Benzol-Disulfonat) verwendet, das ebenfalls eine indirekte Messung der Zellvitalität anhand der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität ermöglicht. Dabei bewirken vitale Zellen durch

die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen eine enzymatische Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 in ein dunkelrotes Formazan. Mit Hilfe eines Spektralphotometers kann diese Farbveränderung photometrisch bestimmt und ausgewertet werden (Francoeur und Assalian, 1996).

Die Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 wurde in der vorliegenden Arbeit nur bei den Sec61 α Knockdown-Experimenten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie in Punkt 2.16 beschrieben, mit siRNA in 12 Well-Mikrotiterplatten transfiziert und danach 24 h mit den entsprechenden Toxinvarianten behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 500 μ l Medium, welches mit 10 % WST-1 Reagenz der Firma Roche komplementiert wurde, in die einzelnen Wells gegeben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ über den Zeitraum von 60 min. Die Absorption der Ansätze wurde im Microplate Reader Infinite M200 der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 690 nm gemessen. Parallel dazu wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt und eine dreifach Bestimmung der Proben durchgeführt. Die relative Vitalität wurde mit der folgenden Formel errechnet.

$$\text{Vitalität} = \frac{(\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Medium}})}{(\text{Absorption}_{\text{Negativkontrolle}} - \text{Absorption}_{\text{Medium}})} \times 100$$

2.16 Sec61 α ₁- Silencing Experimente

Das Prinzip der RNA-Interferenz beruht auf einer posttranskriptionalen Degradation der zellulären mRNA spezifischer Gene. Diese wird durch kurze RNAs mit einer Nukleotidlänge von 19-25 bp, den sogenannten „short interfering RNAs“ (siRNAs) vermittelt (Hamilton und Baulcombe, 1999). Die synthetisch hergestellten siRNAs werden dazu in die Zellen transfiziert, wo sie durch den RISC-Komplex erkannt werden (Elbashir *et al.*, 2001; Filipowicz, 2005). Dieser trennt dabei die beiden RNA-Stränge der siRNA und ermöglicht die Erkennung der komplementären Ziel-mRNA durch den Antisense-Strang der siRNA. Bei der Verwendung von größeren dsRNA-Molekülen werden diese vor der Bildung des RISC-Komplexes durch das DICER-Enzym aufgrund einer RNaseIII-Aktivität in ca. 20 Basen lange Fragmente (siRNA) gespalten. Im Anschluss folgt in beiden Fällen die vollständige Degradation der mRNA durch Endonuklease-spezifische Spaltung der mRNA innerhalb der siRNA-Zielsequenz (Tolia und Joshua-Tor, 2007). Damit unspezifische Effekte durch die Transfektion auszuschließen sind, wird als Vergleich eine Kontroll-siRNA (ctrl-siRNA) der Firma Qiagen, die keine Homologien zu humanen Sequenzen aufweist, in

gleicher Konzentration mitgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmermann (Universität des Saarlandes, Homburg) verwendet. HeLa-S3 Zellen wurden einen Tag vor der eigentlichen Transfektion passagiert, damit sie sich am Folgetag in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden vor der siRNA-Transfektion geerntet (Punkt 2.4.3), die Zellzahl bestimmt und $1,2 \times 10^5$ Zellen in Polylysin-beschichtete 12 Well-Mikrotiterplatten in 1,1 ml DMEM+Gluta-Max Medium ausgesät. Die Polylysin-Beschichtung der Wells erfolgte zuvor durch die Behandlung mit 300 μ l einer 0,1 mg/ml Polylysin-Lösung für 30-60 min bei RT und zwei anschließenden Waschschritten mit 1 x PBS. Im Anschluß wurde der Transfektionsansatz in einem Volumen von 106 μ l angesetzt, anschließend gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Die eingesetzten siRNAs sind in der Tabelle 8 beschrieben. Nach Zugabe der Transfektionsansätze wurden die Zellen 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert, dann das Medium entfernt und die Zellen nochmals mit der gleichen Menge an siRNA nachtransfiziert und weitere 72 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde erneut das Medium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, 400 μ l neues Medium hinzugegeben und mit 100 μ l der entsprechenden Toxinkonzentrate und Negativkontrollen komplementiert. Vor dem Experiment wurde mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstests die Toxinmenge bestimmt, bei der eine Abnahme der HeLa-Zellvitalität von ca. 50 % nach 24 h zu beobachten war und die entsprechende Toxinmenge in 100 μ l aufgenommen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellvitalität bestimmt (Punkt 2.15.3). Zur Bestimmung der Silencing-Effizienz wurden die Zellen danach geerntet und gleiche Ansätze mit den entsprechenden zuvor gesammelten Medienüberständen gepoolt. Die Zellzahl der Ansätze wurde mit Hilfe des Zellzählers Countless® Automated Cell Counter von Invitrogen bestimmt und die Zellen anschließend für 10 min bei 3.000 rpm pelletiert. Um einen Verbesserung des Sec61 α -Nachweises zu erzielen, wurden die Zellen einer Digitonin-Behandlung unterzogen. Dazu wurden die Zellen in 10 ml PBS pH = 7,4 aufgenommen und mit 5 μ l einer 40 mg/ml Digitonin-Stammlösung (gelöst in DMSO) komplementiert. Nach 5 min auf Eis wurden die Zellen erneut bei 3.000 rpm abzentrifugiert, die Pellets in 4/5 Volumen Lysepuffer und 1/5 Volumen 5 x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, resuspendiert und 15 min bei 57°C inkubiert. Die anschließende Fragmentierung der DNA erfolgte für 10 min durch Vortexen bei mittlerer Stufe. Die Menge an zugegebenen Lyse- und Probenpuffer wurde so gewählt, dass eine definierte Zellzahl von 1×10^4 Zellen pro μ l Ansatz entstand. Zur Verifizierung der Silencing-Effizienz wurden die Proben dann in einer SDS-PAGE nach Lämmli (1970) aufgetrennt und mittels Western Analyse („Nass-Blot“-Methode) untersucht. Die Durchführung der SDS-PAGE sowie der Western Analyse erfolgte analog zu

den in der Dissertation von Cappel (2011) beschriebenen Protokollen. Als primärer Antikörper kam ein Anti-Sec61 α Peptid-Antikörper in der Verdünnung von 1:200 zum Einsatz. Dieser richtet sich gegen die letzten zwölf Aminosäuren des C-Terminus von Sec61 α . Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um einen HRP-gekoppelten Anti-Rabbit Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (Tabelle 7).

Transfektionsansatz

HiPerFect	6 μ l
Control bzw. Sec61 _{A1} -UTR siRNA (20 nM)	1,2 μ l
Opti-MEM [®]	98,8 μ l

Lysepuffer

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	30 mM
NP40	5 %
PLAC (100 mM)	1 %
PMSF (100 mM)	0,1 %

PLAC-Stammlösung

Pepstatin	25 mg
Leupeptin	25 mg
Antipain	25 mg
Chymostatin	25 mg

Jeder Proteaseinhibitor wurde in 2,08 ml DMSO gelöst und alle Lösungen vereint, so dass eine Endkonzentration von 3,004 mg/ml entstand.

2.17 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Signifikanz von Messwerten wurde der t-Test angewendet. Eine statistische Signifikanz liegt vor, wenn der errechnete p-Wert kleiner oder gleich 0,05 ist. Innerhalb der Arbeit wird $p \leq 0,05$ mit *, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit *** abgekürzt.

2.18 Durchflusszytometrie (FACS)

2.18.1 Quantitative Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur quantitativen Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde in der vorliegenden Arbeit die Durchflusszytometrie eingesetzt. Dazu wurden 2×10^5 Zellen mit dem Plasmid pAcGGSM2-IRES-GFP (Tabelle 6) analog zum Protokoll aus Punkt 2.8.3 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet (Punkt 2.4.3), in 500 μ l FACS-Flow-Lösung von BD aufgenommen und die Anzahl der GFP-positiven Zellen mit Hilfe des FACSCalibur von BD (vgl. Manual BD FACSCalibur Instructions For Use) bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuestTM pro Software von BD.

2.19 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Lokalisationsnachweis von intrazellulär exprimierten Proteinen in Säugerzellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Ähnlich wie bei der Immunodetektion der Western-Analyse werden auch hier die gewünschten Proteine durch enzymespezifische Antikörpern in fixierten und permeabilisierten Zellen nachgewiesen. Dabei unterscheiden sich die verwendeten sekundären Antikörper darin, dass sie nicht mit einem biologisch aktiven Enzym, sondern mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind. Der im Rahmen der Arbeit eingesetzte sekundäre FITC-gekoppelte Antikörper ist in Tabelle 7 beschrieben. Bei einer Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge von $\lambda_A = 490$ nm fluoreszieren der Farbstoffe FITC grün-gelblich ($\lambda_E = 525$ nm).

Hierzu wurden 1×10^5 Zellen auf runden Deckgläsern (Durchmesser 10 mm) von Thermo Scientific in 48 Well-Mikrotiterplatten ausgesät, 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten (Tabelle 6) nach dem in Punkt 2.8.3 beschriebenen Protokoll transfiziert. Nach 2- bis 24-stündiger Transfektion wurden die Zellen in 100 % eiskaltem Methanol 30 min fixiert und permeabilisiert, danach dreimal 10 min mit 1 x PBS gewaschen, bevor die einstündige Inkubation der Deckgläser mit 40 μ l des 1:10 verdünnten primären Antikörpers bei RT durchgeführt wurde. Danach wurden die Zellen erneut dreimal 10 min mit 1 x PBS gewaschen, mit dem sekundären Antikörper (1:100) 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und nach weiteren vier Waschschritten mit dem gebrauchsfertigen DAPI-haltigem Mounting-Medium VECTRASHIELD[®] von Vector Laboratories behandelt. Die Proben wurden mit dem in Punkt 2.20.2 erwähnten Fluoreszenzmikroskop und Programm analysiert und bearbeitet. Die Aufnahmen wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung mit dem Objektiv Plan Apo 20x/0,75 von Nikon durchgeführt.

2.20 Mikroskopie-Methoden

2.20.1 Phasenkontrast-Mikroskopie

Für die morphologische Untersuchung von Säugerzellen nach Toxinbehandlung wurde die Phasenkontrast-Mikroskopie eingesetzt. Dieses von Zernike (1955) entwickelte mikroskopische Verfahren dient der Darstellung von kontrastarmen, ungefärbten Objekten, wie z. B. Zellkernen sowie lebenden Zellen unter der Ausnutzung der Phasenunterschiede der einzelnen Lichtwellen, die beim Durchtritt durch ein optisch dichteres Medium entstehen.

Hierzu wurden 1×10^5 Zellen pro Well in 24 Well-Mikrotiterplatten für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Toxinkonstrukten über einen Zeitraum von 2 h bis 48 h. Abschließend wurden die Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop Olympus IX 70 von Olympus unter Standardeinstellung mit unterschiedlichen Vergrößerung (10 x: Olympus UPLAN FL Ph 1; 20 x: Olympus LC PLAN FL 0,4 Ph 1; 40 x: Olympus LC PLAN FL 0,6 Ph2) untersucht. Zur Untersuchungen von Trypanblau-behandelten Zellen wurde die Zellen nach dem in Punkt 2.15.1 beschriebenen Protokoll gefärbt und anschließend im Phasenkontrast-Mikroskop analysiert.

2.20.2 Fluoreszenzmikroskopie

Diese spezielle Form der Lichtmikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von GFP-getaggten Konstrukten eingesetzt. Das Prinzip beruht dabei auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Die Fluoreszenz entsteht bei der Anregung von fluoreszierenden Stoffen, sogenannten Fluorophoren, durch Licht einer spezifischen Wellenlänge, wobei diese einige Nanosekunden später Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Dieses Phänomen kann durch Energieübergänge in den Fluorophoren erklärt werden. Dabei werden nach der Anregung eines Fluorophors Elektronen aus dem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen auf das Grundniveau wird die frei werdende Energie in Form von Emissionslicht ausgesendet. Das emittierte Licht ist dabei immer langwelliger und energieärmer als das anregende Licht (Stokes-Verschiebung). Durch die Verwendung spezifischer Filter kann das Anregungs- und Emissionslicht optisch voneinander getrennt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8000K der Firma Keyence verwendet. Der Fluoreszenznachweis in Bakterienzellen erfolgte bei einer 100-fachen Vergrößerung mit dem Objektiv Plan Apo VC 100X/1.40 Oil von Nikon, während bei

Säugerzellen das Objektiv Plan Apo 20x/0,75 von Nikon bei einer 20-fachen Vergrößerung eingesetzt wurde. Die Filtersets OP-66835 (GFP) und OP 66834 (DAPI) der Firma Keyence wurden unter Standardeinstellungen verwendet. Die entstandenen Fotos wurden mit dem Programm BZ Analyzer von Keyence ausgewertet.

2.20.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie gelangen aufgrund einer zusätzlichen Lochblende nur Fluoreszenzsignale aus der Fokusebene der angeregten Probe in den Detektor, bei dem es sich um eine Photomultiplier-Einheit handelt. Diese Modifikation hat den entscheidenden Vorteil, dass Hintergrundsignale aus höher und niedriger liegenden Schichten ausgeblendet werden. Der Laserstrahl rastert dabei in der vorliegenden x-y-Ebene Punkt für Punkt ab und rekonstruiert aus den Daten der Einzelpunkte das endgültige Bild. Durch das Scannen übereinander liegender Schichten können auch dreidimensionale Bildstapel („z-stacks“) erzeugt werden. Dadurch kann - im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie - sowohl die räumliche Auflösung verbessert als auch Verlust von Fluoreszenz durch Ausbleichen der Probe verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Aufnahmen zur Kolokalisation der verschiedenen eGFP-RTA-Varianten in Säugerzellen mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop LSM 510 META der Firma Carl Zeiss GmbH (Jena) mit einem 100 x Objektiv von Zeiss (Öl, numerische Apertur 1,3) angefertigt. Die eingesetzten Filtersets sind in Tabelle 11 aufgelistet. Dazu wurden 2×10^5 Zellen auf speziell für die CLSM-Mikroskopie ausgelegten 24 Well-Mikrotiterplatten (Imaging Plates FC, PAA) ausgesät und nach 18 h mit den entsprechenden eGFP-Toxininfusionen behandelt. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und zeitnah im CLSM-Mikroskop analysiert. Zur Färbung der Plasmamembran und Zellkerne wurden die Zellen zusätzlich 10 min bei RT mit einer 1:400 Rhodamin-gelabelten RCA/PBS-Lösung gefärbt, zweimal mit 1 x PBS gewaschen und 20 min mit 1 % Paraformaldehyd fixiert. Dann wurden die Zellen 5 min mit einer 0,2 µg/ml DAPI-Lösung behandelt und nach zwei weiteren PBS-Waschschritten analysiert.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Filtersets zur konfokalen Laserscanning-Mikroskopie

Fluoreszenzprotein	Laserwellenlänge (nm)	Beam splitter	Filter
eGFP	488	HFT:488; NFT:490	BP 500-530
mCherry	543	HFT:514; NFT:545	LP 560

3. Ergebnisse

Das zur Klasse der RIPs gehörende Pflanzentoxin Ricin stellt ein wichtiges Forschungsgebiet in der Medizin dar. Sowohl das Fehlen eines effektiven Gegenmittels als auch die vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Krebstherapie sind zwei Hauptgründe, den komplexen Aufnahme- und Transportweg von Ricin im Detail zu erforschen. Auch die Entwicklung innovativer Test- und Modellsysteme ist unerlässlich, um unbeantwortete Fragen bezüglich des intrazellulären Transports von Ricin genauer zu untersuchen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können künftig zur Entwicklung neuartiger und effektiver Behandlungstherapien gegen Krebs beitragen sowie einen potentiellen Missbrauch als terroristische Waffe verhindern.

Das übergeordnete Ziel der Punkte 3.1 bis 3.4 war dabei die Analyse der Endozytose und des intrazellulären Transports der katalytischen A-Kette von Ricin (RTA) in Säugerzellen. Bereits frühere Untersuchungen konnten belegen, dass auch RTA ohne seine zellbindende RTB-Untereinheit Säugerzellen intoxifizieren kann, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bislang nicht aufgeklärt wurde. Neben der Herstellung und Reinigung verschiedener biologisch aktiver RTA-Varianten aus *E. coli* wurde deren Aufnahme und toxische Wirkung in verschiedenen Säugerzelllinien analysiert, um neue Erkenntnisse über deren Intoxifikationsweg zu erhalten. Darüberhinaus wurden fluoreszenzmarkierte Toxinvarianten konstruiert, um deren Aufnahme und Transport in Säugerzellen in Echtzeit zu verfolgen. Ein weiterer Aspekt bestand zudem in der Untersuchung der intrazellulären Expression verschiedener RTA-Varianten in Säugerzellen. Im letzten Punkt wurde der Frage nachgegangen, inwieweit das Sec61-Translokon am Transport von RTA im Säuger beteiligt ist.

Der Fokus der Punkte 3.5 bis 3.7 lag in der Etablierung innovativer hefebasierter Testsysteme zur Untersuchung der Endozytose und des intrazellulären Transports von RTA in Hefezellen. Diese Systeme sollen die praktischen Limitierungen bisheriger Untersuchungen von RTA im Modellorganismus Hefe umgehen und neue Erkenntnisse sowie Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede bezüglich des Toxintransports in Säugerzellen liefern. Im letzten Untersuchungspunkt wurde aufbauend auf den Untersuchungen von Schnöder (2009) der Einfluss einer Prä-Pro-Signalsequenz des K28-Killertoxins auf den effizienten ER-Import von RTA nach intrazellulärer Expression in Hefen analysiert.

3.1 Herstellung von unterschiedlich modifizierten RTA-Varianten

Unter natürlichen Bedingungen ist die Bindung der B-Untereinheit (RTB) an terminale Kohlenhydrate von Glykolipiden bzw. -proteinen für die effektive Aufnahme von Ricin in die Säugerzelle verantwortlich. Unterschiedliche Untersuchungen haben dennoch gezeigt, dass die katalytische A-Kette von Ricin auch ohne Beteiligung der B-Kette von Säugerzellen endozytiert und bis in das Zytosol transportiert werden kann. Zum Beispiel führt die extrazelluläre Zugabe hoher RTA-Dosen (50-80 µg/ml) zur signifikanten Inhibierung der Proteinbiosynthese. Des Weiteren verursacht die Modifikation von RTA mit dem säugerspezifischen ER-Retentionsignal KDEL eine gesteigerte *in vivo* Toxizität bei unterschiedlichen Säugerzelllinien (Wales *et al.*, 1992; Wales *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 1998). Es ist jedoch nicht genau bekannt, wie die gesteigerte Toxizität bei Säugerzelllinien im Detail vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob das Anfügen eines hefespezifischen ER-Retentionssignals HDEL ebenfalls eine verstärkte Toxizität in Säugerzellen hervorruft und inwieweit sich diese Toxizität von einer unmodifizierten bzw. KDEL-tragenden Variante unterscheidet. Des Weiteren sollte die Toxizität wildtypischer RTA-Varianten mit mutierten Varianten, die durch den bestimmten Austausch von Aminosäuren eine reduzierte Aktivität besitzen, verglichen werden. Die Grundvoraussetzung für die Untersuchung dieser Fragestellungen war die Herstellung ausreichender Mengen biologisch aktiver Toxinvarianten. Zu diesem Zweck wurden neun unterschiedliche Toxinvarianten konstruiert (Abbildung 9).



Abbildung 9: Konstrukte zur Expression unterschiedlicher RTA-Varianten mit C-terminalem ER-Retentionssignal. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der 5'- bzw. 3'-Enden sowie die Basenanzahl der Konstrukte sind dargestellt. Sowohl das His₆-Tag (His) als auch das hefespezifische (HDEL) und säugerspezifische (KDEL) ER-Retentionssignal wurden durch PCR angefügt. Parallel wurden identische Konstrukte für RTA^{E177D} und RTA^{R180H} hergestellt.

Die Konstrukte mit wildtypischer RTA-Sequenz wurden mit den entsprechenden Primern (Tabelle 10) aus dem Ausgangsplasmid pRS316-Kar2_{SP}-RTA (Tabelle 5) amplifiziert. Dabei wurden die 5'- und 3'-Enden mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen und die 3'-Enden der Konstrukte zusätzlich mit einem His₆-Tag und den verschiedenen Retentionssignalen versehen. Das angefügte His₆-Tag diente im späteren Verlauf der effektiven Toxinreinigung. Parallel dazu wurden identisch modifizierte RTA^{E177D}-Konstrukte aus dem Ausgangsplasmid pJC2433gem-pre_RTΔ amplifiziert (Tabelle 5). Um die RTA^{R180H}-Varianten zu erhalten, wurde bei den verschiedenen wildtypischen RTA-Konstrukten die Aminosäure Arginin an Position 180 mittels SOE-PCR zu Histidin umgewandelt (Tabelle 10). Die daraus resultierenden RTA^{E177D}-Varianten besitzen im Vergleich zu den wildtypischen Varianten eine 50-fach reduzierte Aktivität, während RTA^{R180H} eine um das 500-fache verringerte Aktivität aufweist (Allen *et al.*, 2007; Day *et al.*, 1996). Die heterologe Expression der konstruierten Toxinvarianten erfolgte in *E. coli*.

3.1.1 Expression und Reinigung der modifizierten RTA-Varianten in *E. coli*

Zur Expression der rekombinanten RTA-Konstrukte in *E. coli* wurde das pET-System von Novagen eingesetzt. Der dabei verwendete Stamm BL21(DE3) exprimiert eine Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase, die sich unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors befindet. Die T7-RNA-Polymerase bindet anschließend an den T7-Promotor des pET-Vektors und induziert die Transkription der einklonierten Zielgene (Studier und Moffatt, 1986). Mit diesem System konnten bereits eine Vielzahl rekombinanter Proteine, darunter auch verschiedene RTA-Derivate, erfolgreich in *E. coli* hergestellt werden (Chen *et al.*, 2005; Li-Ya *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Zunächst wurden die sequenzierten Konstrukte durch *Bam*HI/*Sal*I-Restriktion in den Expressionsvektor pET24a⁽⁺⁾ eingebracht und in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Anschließend wurden die Expressionsbedingungen hinsichtlich der Parameter Temperatur (20°C, 28°C, 37°C), Expressionszeit (2 h, 6 h, 24 h) und IPTG-Konzentration (0,5 mM und 1 mM) optimiert. Die Kombination aus 1 mM IPTG und 28°C über einen Zeitraum von 2 h bis 6 h ergab dabei die optimalen Bedingungen für die Toxinexpression (Daten nicht gezeigt). Bei höheren Expressionszeiten (24 h) war hingegen keine Expression mehr nachweisbar. Des Weiteren sollten Temperaturen von 20°C bis 28°C für die Toxinexpression verwendet werden, da es dabei zu einer deutlich geringeren Bildung sogenannter „inclusion bodies“ kommt. Dabei handelt es sich um fehlerhaft oder unvollständig gefaltete Proteine, die im Zuge einer zu starken Proteinexpression in den Zellen akkumulieren. Nach der Expression wurden die

Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und die Expression durch Western-Analyse oder Coomassie-Färbung verifiziert. Abbildung 10A zeigt beispielhaft den Nachweis von RTA_{His}^{KDEL}. Das Molekulargewicht der Variante lag bei ca. 31 kDa (RTA_{His}^{KDEL}: 31,5 kDa), während bei der Negativkontrolle keine Bande sichtbar war. Bei der Expression der verschiedenen RTA^{E177D}- (Abbildung 10B) bzw. R180H-Varianten (Daten nicht gezeigt) konnten auch deutliche Banden bei ca. 31 kDa im Coomassie-Gel nachgewiesen werden.

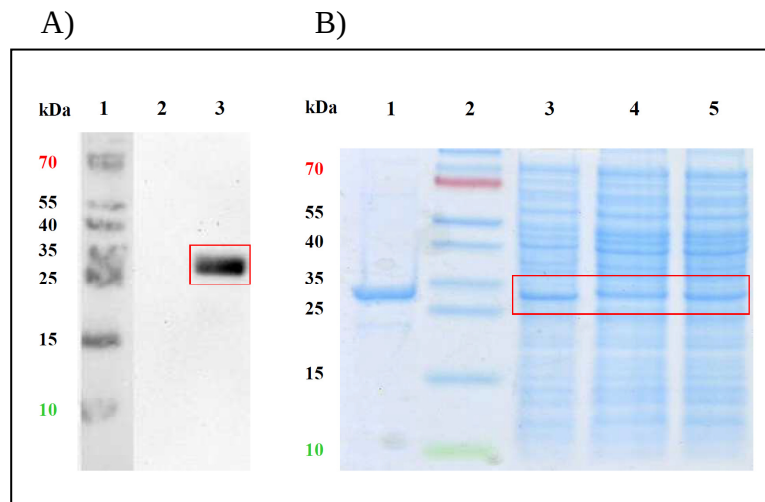


Abbildung 10: Nachweis der Expression von RTA-Varianten in *E. coli*.

A) Western-Analyse des Zelllysats von *E. coli* BL21(DE3)[pET-RTA_{His}^{KDEL}] unter reduzierenden Bedingungen (28°C und 1 mM IPTG, 2 h Inkubation). Die Detektion erfolgte durch Anti-RTA-Antikörper und HRP-gekoppelte Anti-Sheep-Antikörper (rote Umrandung = RTA).

- (1) Proteingrößenstandard
- (2) Negativkontrolle BL21 [pET24 a⁽⁺⁾]
- (3) BL21 [pET-RTA_{His}^{KDEL}]

B) Coomassie-Färbung verschiedener *E. coli* Lysate nach Zellaufschluss (rote Umrandung = RTA).

- (1) Positivkontrolle (gereinigtes RTA_{His}^{KDEL})
- (2) Proteingrößenstandard
- (3) BL21 [pET-RTA_{His}^{E177D}]
- (4) BL21 [pET-RTA_{His}^{E177D HDEL}]
- (5) BL21 [pET-RTA_{His}^{E177D KDEL}]

Im Anschluss wurden alle His₆-getaggten RTA-Varianten aus den Zelllysaten mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Punkt 2.10.1) erfolgreich gereinigt. In Abbildung 11 sind die entsprechenden Banden bei ca. 31 kDa zu erkennen. Nach der Umpufferung in PBS pH 7,4 lag die Gesamtproteinausbeute der unterschiedlichen Toxinvarianten zwischen 25-50 mg/l, wobei die geringste Ausbeute bei den unmodifizierten Varianten zu verzeichnen war. Zudem besaßen die gereinigten Proben eine geschätzte Reinheit von ca. 90-95 % (Abbildung 11). Die Abschätzung erfolgte dabei durch den Vergleich einer mit dem Grundvektor pET24a⁽⁺⁾ transformierten Kultur. Diese wurde unter identischen Bedingungen kultiviert, induziert und gereinigt und in den weiteren Untersuchungen als Negativkontrolle bezeichnet. Die Ausbeute und Reinheit der Konstrukte ist vergleichbar mit den Ergebnissen

von Wang *et al.* (2005), der ca. 60 mg RTA aus 1 l *E.coli*-Kultur reinigen konnte (Wang *et al.*, 2005).

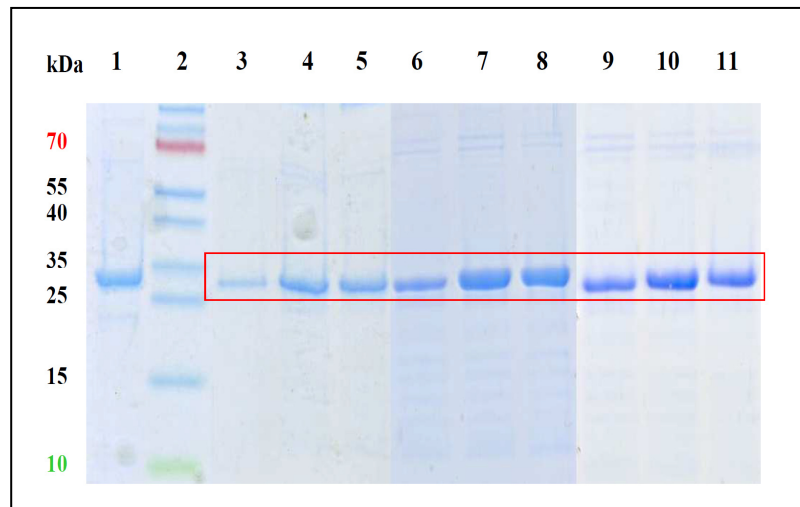


Abbildung 11: Nachweis der affinitätschromatographischen Reinigung der RTA-Varianten durch Coomassie-Färbung. In den Spuren sind die gereinigten Eluate nach der Umpufferung in PBS pH 7,4 aufgetragen (rote Umrandung = RTA).

- (1) Positivkontrolle (gereinigtes RTA_{His}^{KDEL})
- (2) Proteingrößenstandard
- (3) RTA^{E177D}_{His}
- (4) RTA^{E177D}_{His}^{HDEL}
- (5) RTA^{E177D}_{His}^{KDEL}
- (6) RTA_{His}
- (7) RTA_{His}^{HDEL}
- (8) RTA_{His}^{KDEL}
- (9) RTA^{R180H}_{His}
- (10) RTA^{R180H}_{His}^{HDEL}
- (11) RTA^{R180H}_{His}^{KDEL}

Insgesamt war es somit möglich, die verschiedenen wildtypischen und mutierten RTA-Varianten in *E. coli* im Milligramm-Bereich zu exprimieren und die Fremdprotein-Verunreinigungen durch den Reinigungsschritt zu minimieren. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde die biologische Aktivität der gereinigten RTA-Varianten nachgewiesen.

3.1.2 Nachweis der biologischen Aktivität der RTA-Varianten

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurden *in vivo* Toxizitätsstudien mit den gereinigten, in PBS-umgepufferten RTA-Varianten in einer HeLa-Zelllinien durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine Behandlung mit RTA toxisch auf diese Zelllinie wirkt (Wales *et al.*, 1992). Der Nachweis der Toxizität erfolgte dabei auf drei unterschiedlichen Wegen. Zuerst wurde die Zellmorphologie und -adhärenz von HeLa-Zellen mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Sowohl die Behandlung mit RTA_{His}^{HDEL} als auch RTA_{His}^{KDEL} führte zum Verlust der Zelladhärenz (Abbildung 12A). Der

überwiegende Teil der Zellen löste sich von der Kulturschale und wies eine deformierte Zellmorphologie auf. Im Gegensatz dazu waren keine sichtbaren morphologischen Unterschiede zwischen Negativkontrolle und RTA_{His}-behandelten Zellen zu erkennen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei den abgelösten Zellen um tote Zellen handelte. Diese Vermutung konnte durch Trypanblau-Färbung belegt werden.

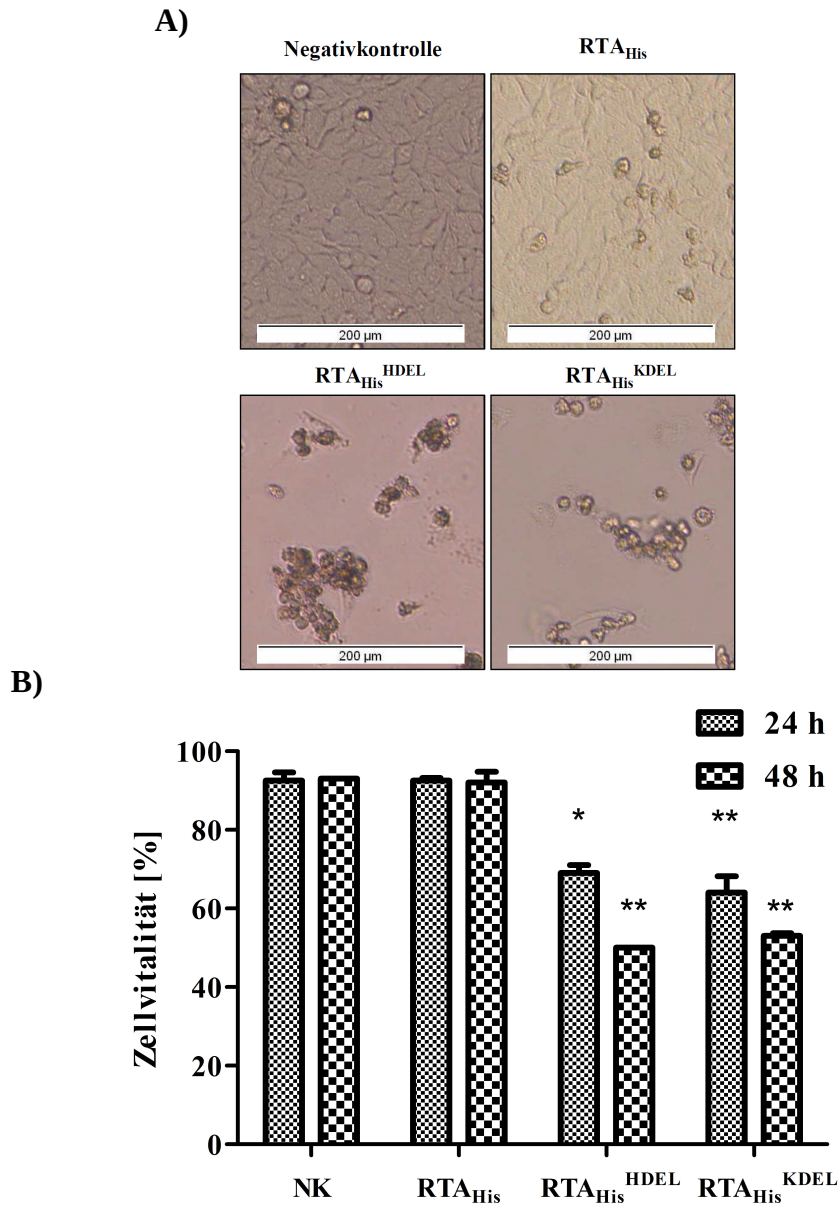


Abbildung 12: Nachweis der *in vivo* Toxizität gereinigter RTA-Varianten gegenüber HeLa-Zellen. **A)** Phasenkontrastmikroskopie von RTA-behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit den unterschiedlichen RTA-Varianten (24 µg/ml) bzw. der Negativkontrolle (NK, gereinigtes Eluat von BL21[pET24a⁽⁺⁾]) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend bei einer 10.000-fachen Vergrößerung analysiert (Punkt 2.20.1). **B)** Quantitative Auswertung der Zellvitalität von HeLa-Zellen mittels Trypanblau-Färbung. Die Zellen wurden 24 h bzw. 48 h mit den dargestellten RTA-Varianten (24 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalität in [%] bestimmt. Die Stichprobengröße betrug n = 2. Im Diagramm sind die Standardabweichung und die Signifikanz (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01) angegeben. Als Referenz für die Signifikanz diente die Negativkontrolle.

Zur quantitativen Bestimmung der Zellvitalität von HeLa-Zellen wurde als zweite Methode der Trypanblau-Vitalitätstest (Punkt 2.15.1) eingesetzt. Trypanblau dient dabei zur Unterscheidung lebender und toter Zellen, da nur letztere den Farbstoff aufnehmen und selektiv angefärbt werden. Abbildung 12B zeigt beispielhaft die Auswertung der Zellvitalität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Toxinvarianten über einen Zeitraum von 24 h bzw. 48 h. Die Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen der zellmorphologischen Untersuchungen wider. Lediglich in den Proben mit hefe- bzw. säugerspezifischen ER-Retentionssignal war ein signifikanter Verlust der Zellvitalität zu beobachten, wohingegen die Vitalität durch die Negativkontrolle sowie unmodifiziertes RTA nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise zeigten sowohl $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{HDEL}}$ - bzw. $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ -behandelten HeLa-Zellen eine ähnliche Zellvitalität von 50 % bzw. 53,5 % nach 48 h. Auch beim 24 h-Messpunkt war keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellvitalitäten zu erkennen.

In der dritten Methode wurde die biologische Aktivität durch einen deutlich sensitiveren XTT-basierten Toxizitätstest (Punkt 2.15.2) bestätigt. Dieser etablierte Toxizitätstest wird zur Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität in Zellen verwendet, was ein indirektes Maß für deren Zellvitalität darstellt. Um einen genauer Überblick über die toxische Wirkung der verschiedenen wildtypischen RTA-Varianten zu erhalten, wurden zunächst die Parameter Inkubationszeit (2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h) und Toxindosis (0,2 µg/ml bis 160 µg/ml) systematisch variiert.

In Abbildung 13 wurde die Auswirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen näher untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellvitalität bei $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ - und $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{HDEL}}$ -behandelten Zellen mit zunehmender Inkubationszeit stark abnimmt. In den ersten 12 h zeigten beide Varianten nur eine schwache Abnahme der Vitalität auf ca. 85 % bis 80 %. Bei Inkubationszeiten von 24 h bzw. 48 h war hingegen eine starke Verringerung der Zellaktivität auf ca. 30 % bzw. 13 % zu beobachten. Die Zellvitalitäten der 12 h-, 24 h- und 48 h-Werte unterschieden sich auch statistisch signifikant von den Ansätzen der Negativkontrolle. Die Bestimmung der Zellvitalitäten der Pufferkontrolle (PBS pH 7,4) ergab ähnliche Werte wie bei der Negativkontrolle, wodurch ein toxischer Effekt des Puffers ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt). Bei der Behandlung der Zellen mit RTA_{His} konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Verringerung der Vitalität festgestellt werden. Aufgrund der fehlenden *in vivo* Toxizität von rekombinant in *E. coli* exprimiertem RTA_{His} , wurde die toxische Wirkung von kommerziell erhältlichem RTA (Sigma) untersucht. Die Behandlung zeigte zwar eine deutliche Verringerung der Zellvitalität von HeLa-Zellen (33,2 %), jedoch war bei der Pufferkontrolle (45,3 %) ein ähnlich starker Effekt zu

verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Das kommerzielle pflanzliche RTA war in einem DTT haltigen Puffer (0,5 mM) gelöst, was zur Verringerung der Zellvitalität führte. Unter den Umständen war keine eindeutige Aussage über die *in vivo* Toxizität von kommerziellem RTA möglich und konnte somit nicht mit den Ergebnissen von rekombinanten RTA_{His} verglichen werden. Dennoch zeigten die Resultate, dass zum 24 h- bzw. 48 h-Zeitpunkt ein signifikanter toxischer Effekt bei RTA_{His}^{KDEL} und RTA_{His}^{HDEL} zu beobachten war und sich diese Zeitpunkte hervorragend zur Untersuchung der *in vivo* Toxizität der unterschiedlichen Toxinvarianten in HeLa-Zellen eigneten. Daher wurden diese für die weiterführenden Versuchen verwendet.

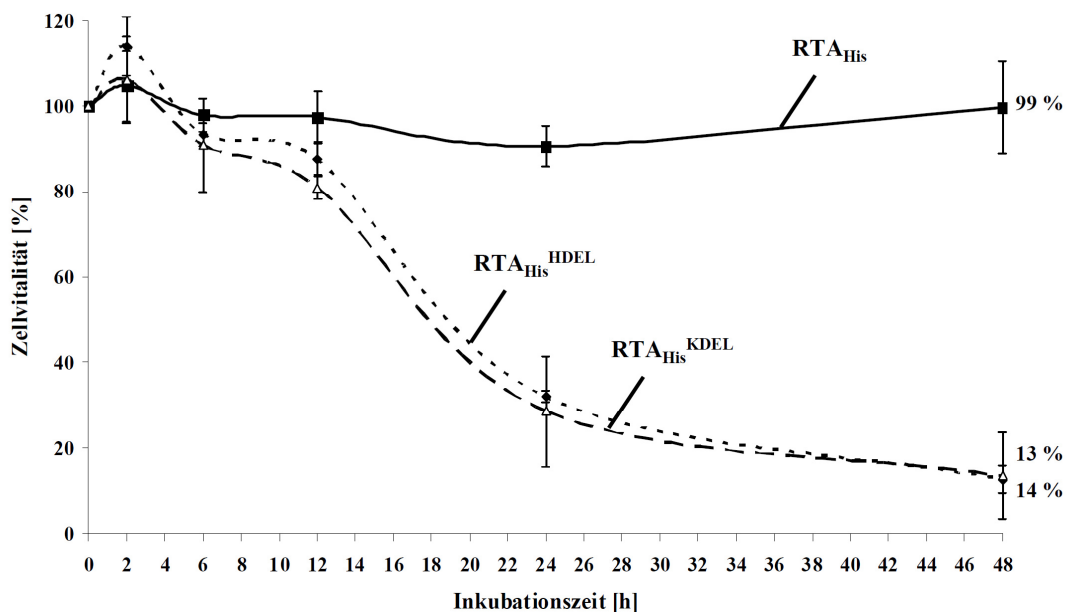


Abbildung 13: Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen RTA-Varianten. HeLa-Zellen wurden jeweils mit 160 µg/ml der dargestellten RTA-Varianten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend die Zellvitalität nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch den XTT-basierten Toxizitätstest bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen. Als Referenz zur Bestimmung der Zellvitalität dienten die Werte der Negativkontrolle.

Im Anschluss wurde der Einfluss unterschiedlicher Toxindosen von RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen näher untersucht (Abbildung 14). Die Varianten mit zusätzlichem HDEL- bzw. KDEL-Retentionssignal verursachten dabei eine signifikante Verringerung der Zellvitalität ab einer Toxindosis von 2 µg/ml. Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Abnahme der Zellvitalität bei beiden Varianten dosisabhängig verläuft. Dabei vermittelt RTA_{His}^{HDEL} eine ähnlich starke toxische Wirkung auf HeLa-Zellen wie RTA_{His}^{KDEL}, was anhand des fehlenden Unterschieds der Zellvitalität bei allen getesteten Toxindosen zu erkennen ist. Die höchste Toxindosis von 160 µg/ml führte bei RTA_{His}^{KDEL} sowie RTA_{His}^{HDEL} zur größten Abnahme der Zellaktivität um ca. 70 %.

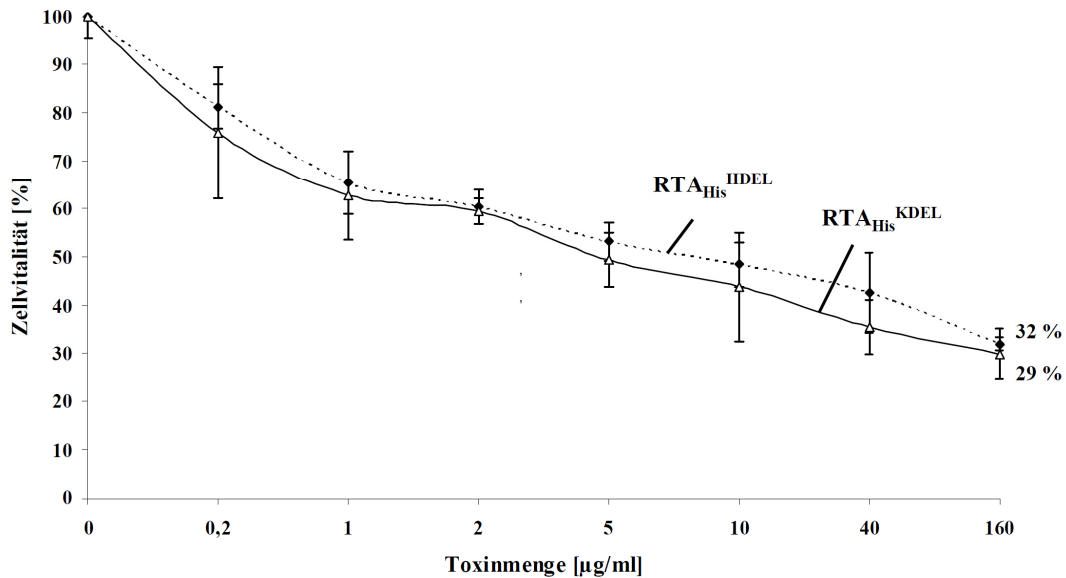


Abbildung 14: Einfluss unterschiedlicher Toxindosen wildtypischer RTA-Varianten auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 h mit unterschiedlichen Toxindosen (0,2 µg/ml bis 160 µg/ml) der dargestellten RTA-Varianten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalität mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstest bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) der Proben durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen.

Für die weiteren Untersuchungen wurden Toxindosen von mehr als 20 µg/ml eingesetzt, da dadurch eine deutliche Reduzierung der Zellvitalität erzielt wurde. Die Ergebnisse eines unter optimierten Bedingungen (24 µg/ml Toxindosis, 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit) durchgeführten Nachweises der biologischen Aktivität sind in Abbildung 15 dargestellt. Im Diagramm ist nach einer 24-stündigen Behandlung mit RTA_{His}^{HDEL} sowie RTA_{His}^{KDEL} eine signifikante Abnahme der Zellvitalität um ca. 30 % zu erkennen. Nach 48 h ist die Zellvitalität im Vergleich zur Negativkontrolle sogar um ca. 70 % zurückgegangen.

Zusammenfassend konnte somit die Bedingungen für die Untersuchung der *in vivo* Toxizität von RTA hinsichtlich der Parameter Induktionszeit (24 h bzw. 48 h) und Toxindosis (≥ 20 µg/ml) optimiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl das Anfügen eines HDEL- als auch KDEL-Retentionssignals zu einer gesteigerten *in vivo* Toxizität von RTA bei HeLa-Zellen führt. Diese ist sowohl dosis- als auch zeitabhängig. Des Weiteren konnte die biologische Aktivität der Varianten RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} belegt werden. Die toxische Wirkung wird zudem allein durch die Toxinvarianten verursacht und ist nicht auf die Aktivität von Fremdproteinen oder Puffern zurückzuführen, da Negativkontrolle sowie Pufferkontrolle keinen Einfluss auf die Zellvitalität zeigten. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden und Bedingungen konnte jedoch keine

biologische Aktivität von RTA_{His} nachgewiesen werden, da die Behandlung mit RTA_{His} keine signifikante Abnahme der Zellvitalität in HeLa-Zellen induzierte.

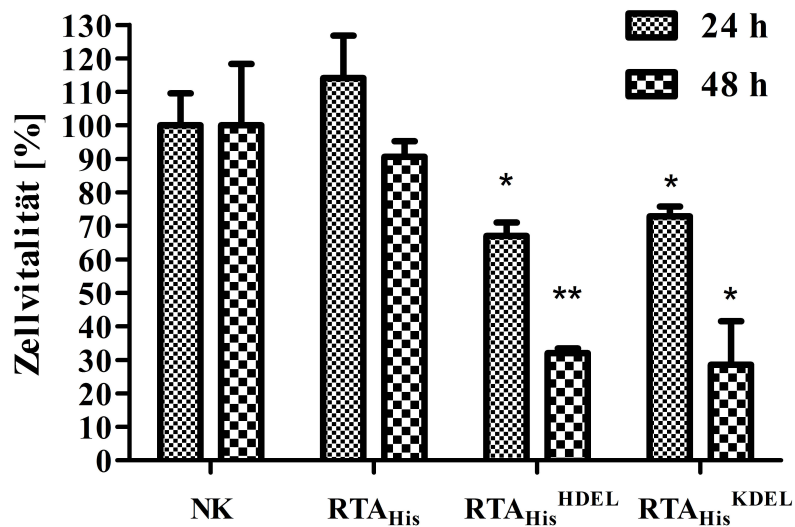


Abbildung 15: Nachweis der biologischen Aktivität unterschiedlicher RTA-Varianten in HeLa-Zellen unter optimierten Bedingungen. Die Zellen wurden 24 h und 48 h mit einer Toxindosis von 24 µg/ml bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalität mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstests bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) der Proben durchgeführt und deren Mittelwerte dargestellt. Im Diagramm sind die Standardabweichung und die Signifikanz (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$) angegeben. Als Referenz für die Signifikanz dienten die Werte der Negativkontrolle.

3.1.3 Analyse der *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{KDEL} in HeLa und HEK293T-Zellen

Neben der Bestimmung der biologischen Aktivität von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA_{His}^{HDEL} in HeLa-Zellen wurde einer weiteren Säugerzelllinie (HEK293T) überprüft. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwieweit sich die Zellvitalitäten von HeLa- und HEK293T-Zellen nach Toxinbehandlung unterscheiden. Säugerzelllinien unterscheiden sich durchaus in ihrer Sensitivität gegenüber RTA. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass RTA^{KDEL} die Proteinbiosynthese bei Vero-Zellen um das ca. 250-fach verringert, wohingegen bei HeLa-Zellen nur eine ca. 10-fache Verringerung zu beobachten war (Wales *et al.*, 1992). Es ist zudem bekannt, dass HEK293T-Zellen durch natürliches Ricin abgetötet werden (Sokolowska *et al.*, 2011). RTA alleine induzierte hingegen keine toxische Wirkung bei HEK293T-Zellen (Wang *et al.*, 2007a). Zur Überprüfung der Eignung wurden lediglich die Zellvitalitäten beider Zelllinien nach Behandlung mit RTA_{His}^{KDEL} verglichen (Abbildung 16). Die Behandlung mit RTA_{His}^{KDEL} über einen Zeitraum von 48 h zeigte in beiden Zelllinien einen ähnlich toxischen Effekt. Die Zellvitalität betrug in beiden Fällen ca. 15 %. Bei denen mit Puffer- bzw. Negativkontrolle-behandelten Zellen war unterdessen keine Abnahme der

Zellvitalität zu beobachten. Somit konnte die *in vivo* Toxizität von $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ ebenfalls in HEK293T-Zellen belegt werden, womit grundsätzlich die Untersuchungen auch an dieser Zelllinie durchführbar sind.

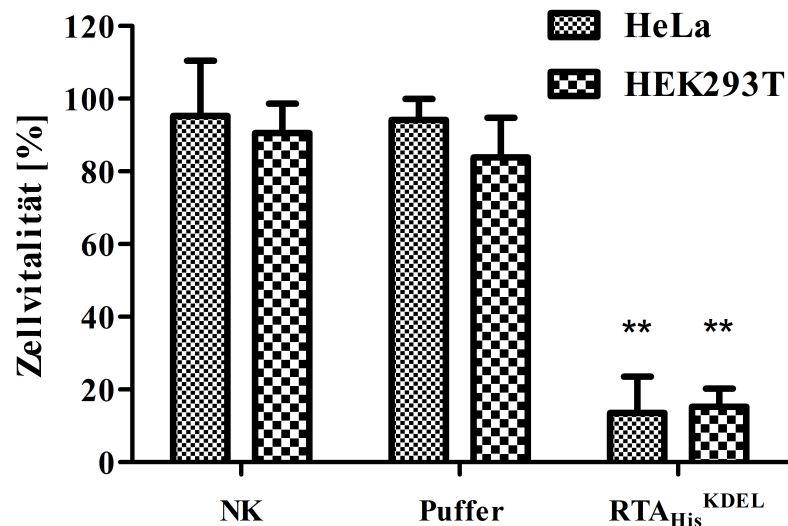


Abbildung 16: Wirkung von $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ auf die Zellvitalität von HeLa- bzw. HEK293T-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit einer Toxindosis von 160 $\mu\text{g/ml}$ bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und die Zellvitalität mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstests bestimmt. Als Referenz zur Bestimmung der Zellvitalität dienten die Werte unbehandelter Zellen. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) der Proben durchgeführt und deren Mittelwerte dargestellt. Im Diagramm sind die Standardabweichungen und die Signifikanzen ($* = p \leq 0,05$) angegeben. Als Referenz für die Signifikanz dienten die Werte der Negativkontrolle.

3.1.4 Studien zur *in vivo* Toxizität unterschiedlicher RTA-Toxinmutanten

Im Nachfolgenden wurde die toxische Wirkung von wildtypischen und mutierten RTA-Varianten *in vivo* miteinander verglichen. Hierzu wurden die Toxinvarianten wie bei den vorherigen Untersuchungen rekombinant in *E. coli* exprimiert, über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigt, in PBS pH 7,4 umgepuffert und abschließend die Zellvitalität nach Behandlung mit den verschiedenen Toxinvarianten bestimmt. In Abbildung 17 ist beispielhaft der Einfluss des Aminosäureaustausches E177D bei der Toxinvariante $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{E177D KDEL}}$ auf die Zellvitalität dargestellt. Dabei wurden die ermittelten Zellvitalitäten mit denen von $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ -behandelten HeLa-Zellen verglichen. Durch die Behandlung mit wildtypischen $\text{RTA}_{\text{His}}^{\text{KDEL}}$ nahm die Zellvitalität bereits bei der geringsten Toxinmenge von 100 $\mu\text{g/ml}$ um etwa 80 % ab. Auch eine Erhöhung der Toxindosis auf 200 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 400 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einer vergleichbaren Abnahme der Zellvitalitäten um ca. 85 %. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit der mutierten Variante eine deutlich verringerte toxische Wirkung auf die Zellen. Die Zellvitalität verringert sich bei 100 $\mu\text{g/ml}$ lediglich um

etwa 33 %. Erst ab einer vierfachen Toxindosis kann eine ähnlich starke Abnahme der Zellvitalität wie bei der wildtypischen Variante erzielt werden.

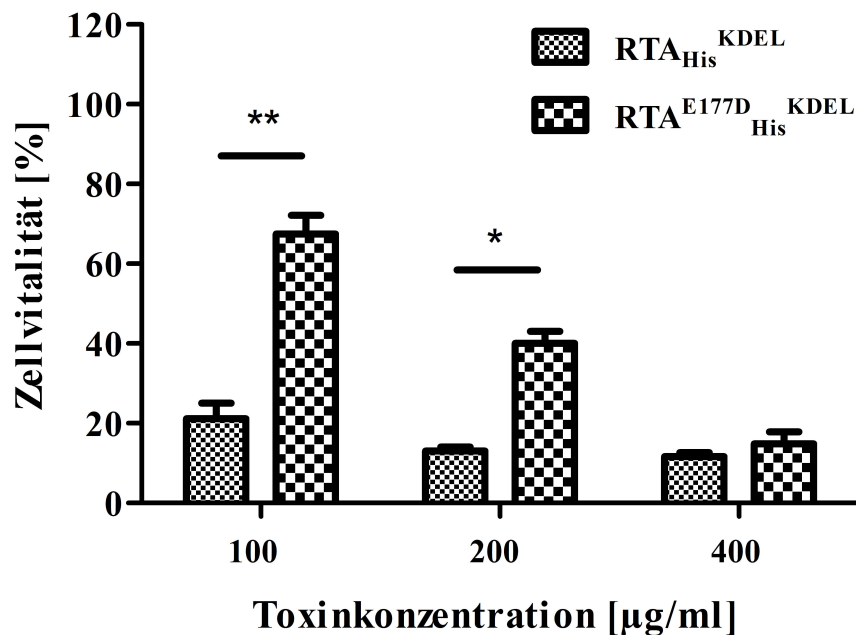


Abbildung 17: Graphische Darstellung der vergleichenden Untersuchungen zur *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA^{E177D}_{His}^{KDEL} in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit den unterschiedlichen Toxinvarianten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalität mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstest bestimmt. Die verwendeten Toxindosen waren dabei 100 µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml. Als Referenz zur Bestimmung der Zellvitalität dienten die Werte der Negativkontrolle. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) der Proben durchgeführt und deren Mittelwerte dargestellt. Im Diagramm sind die Standardabweichung und die Signifikanz (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurden die Werte von RTA_{His}^{KDEL} und RTA^{E177D}_{His}^{KDEL} miteinander verglichen.

Um einen Überblick über die unterschiedlichen toxischen Wirkungen der verschiedenen Toxinvarianten zu erhalten, sind die Werte der einzelnen Zellvitalitätsmessungen in Tabelle 12 nochmals zusammengefasst. Hierbei ist zu erkennen, dass die jeweiligen Varianten ohne Retentionssignal (RTA_{His}, RTA^{E177D}_{His} und RTA^{R180H}_{His}) keine Veränderung der Zellvitalitäten von HeLa-Zellen zeigten. Daher konnten die einzelnen Varianten nicht miteinander verglichen werden. Nur bei der wildtypischen Variante war eine tendenziell stärkere Abnahme der Zellvitalität um ca. 10 % zu beobachten. Die Toxinvarianten mit zusätzlichem HDEL- bzw. KDEL-Retentionssignal hingegen zeigten eine deutliche Verringerung der Zellvitalitäten. Dabei war die Abnahme bei den wildtypischen Varianten am größten (ca. 70 %). Die Zellvitalität der RTA^{E177D}-Varianten war hingegen um ca. 50 % reduziert. Bei den RTA^{R180H}-Varianten (500-fach reduzierte Aktivität) war die geringste Abnahme (ca. 10-20 %) zu beobachten. Zum einen verdeutlichen die Ergebnisse, dass die reduzierte Aktivität der A-Kette eine geringere *in vivo* Toxizität in HeLa-Zellen verursacht.

Zum anderen konnte die biologische Aktivität der RTA^{E177D} bzw. RTA^{R180H} Varianten mit zusätzlichem HDEL- bzw. KDEL-Retentionssignal bestätigt werden. Derartige mutierte RTA-Varianten können bei bestimmten Fragestellungen eine sehr interessante Alternative zu wildtypischen Toxinvarianten darstellen. So kann zum Beispiel die wildtypische Toxizität von RTA zu stark sein, um Protein-Interaktionen oder intrazelluläre Vorgänge *in vivo* zu studieren. In diesen Fällen könnten die in der vorliegenden Arbeit hergestellten mutierten Toxinvarianten eingesetzt werden.

Tabelle 12: Übersicht über die Zellvitalitäten von HeLa-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen RTA-Varianten. Die Zellen wurden 24 h mit jeweils 160 µg/ml der entsprechenden Toxinvarianten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalitäten mittels XTT-basierten Toxizitätstests bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) der Proben durchgeführt. Die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen (SD) sind dargestellt.

Toxinvariante	Zellvitalität [%]	SD [%]
RTA _{His}	90	4,7
RTA _{His} ^{KDEL}	29	13,0
RTA _{His} ^{HDEL}	32	1,4
RTA _{His} ^{E177D}	98	3,2
RTA _{His} ^{E177D} ^{KDEL}	49	3,4
RTA _{His} ^{E177D} ^{HDEL}	56	1,6
RTA _{His} ^{R180H}	96	6,8
RTA _{His} ^{R180H} ^{KDEL}	78	4, 1
RTA _{His} ^{R180H} ^{HDEL}	88	5,9

3.1.5 Untersuchungen zur Aufnahme der RTA-Varianten in Säugerzellen

Abschließend wurde die Aufnahme der Toxinvarianten biochemisch mittels Western-Analyse verifiziert. Hierzu wurden 2 x 10⁵ HeLa-Zellen mit jeweils 160 µg/ml der entsprechenden Toxinvarianten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h, 6 h, 12 h, 24 h) geerntet und die Proben für die Western-Analyse vorbereitet (Punkt 2.9.1.2). Die Detektion der erwarteten Toxinbanden bei ca. 32 kDa mit Hilfe des verwendeten Anti-RTA-Antikörpers war jedoch zu keinem Zeitpunkt möglich (Punkt 2.3.1).

Lediglich in der mitgeführten Positivkontrolle und den Überständen der Medien waren RTA-Signale bei ca. 30 kDa zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Toxizität von RTA reichen bereits wenige Moleküle aus, um die Proteinbiosynthese der Zelle zu hemmen (Eiklid *et al.*, 1980). Es ist daher wahrscheinlich, dass vor dem Absterben der Zelle nicht genügend RTA-Moleküle in der Zelle vorliegen, um diese mittels Western-Analyse zu detektieren. Aus diesem Grund wurde die eingesetzte Zellzahl von 2×10^5 auf 4×10^6 Zellen erhöht, wobei abermals keine Toxinbanden in den Western-Blots zu beobachten waren. Auch die zusätzliche Variation der Toxinmenge (160 µg/ml bis 400 µg/ml), der Einsatz des Proteasomeninhibitors MG132, die Aceton- oder TCA-Fällung der Zelllysate sowie die Detektion mit Anti-His₆-Antikörpern führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Alles in allem war es somit nicht möglich, die Toxinaufnahme biochemisch mit Hilfe der Western-Analyse nachzuweisen. Diese Tatsache deckt sich mit Untersuchungen in Hefe, bei denen der Nachweis von intrazellulär exprimierten RTA mittels Western-Analyse ebenfalls erfolglos verlief (Schnöder, 2009). Aus diesem Grund wird zum Nachweis von RTA in Säuger- und Hefezellen meist die radioaktive Markierung eingesetzt (Li *et al.*, 2011a; Rapak *et al.*, 1997; Schnöder, 2009). Um die Aufnahme der rekombinanten Toxinvarianten dennoch verfolgen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Toxinvarianten hergestellt. Damit konnte zumindest die Endozytose und der intrazelluläre Transport von extrazellulär appliziertem RTA durch mikroskopische Verfahren sichtbar gemacht und in Echtzeit verfolgt werden.

3.2 Herstellung fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten

Fluoreszenzproteine werden häufig zur Proteinlokalisierung in pro- und eukaryotischen Zellen eingesetzt (Campbell und Ashe, 2007; Phillips, 2001). Dabei werden die zu untersuchenden Zielproteine mit dem Fluoreszenzprotein auf genetischer Ebene fusioniert. Im Gegensatz zur klassischen Immunfluoreszenz, bei der der Proteinnachweis erst nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgt, ermöglicht diese Art der Markierung Untersuchungen an lebenden Zellen. Das sogenannte „Live-cell Imaging“ bietet zudem die Möglichkeit, den Transport und die Dynamik von Proteinen fluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche, wildtypische RTA-Varianten mit einer weiterentwickelten Form des wohl prominentesten Vertreters der Fluoreszenzproteine, dem „green fluorescent protein“ (GFP), markiert (Prasher *et al.*, 1992). Dieses als „enhanced“ GFP bezeichnetes Derivat zeichnet sich durch eine verbesserte Fluoreszenz aus, die aufgrund zweier Mutationen hervorgerufen wird (Yang *et al.*, 1996). In

der Literatur ist eine erfolgreiche Expression einer eGFP-getaggten RTA-Variante in *E. coli* bereits mehrfach beschrieben worden (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2010) konnten in ihren Säugerzell-Experimenten keine Toxizität und Aufnahme feststellen, während Lui *et al.* (2006) sowohl die Endozytose als auch Toxizität der RTA-Fusion beschreibt. Die primäre Fragestellung der nachfolgenden Untersuchungen war, inwieweit die Endozytose und der intrazelluläre Transport von Toxinvarianten mit zusätzlichem HDEL- bzw. KDEL-Retentionssignal durch die Markierung mit eGFP *in vivo* analysiert werden kann. Zudem sollten die widersprüchlichen Toxizitätsergebnisse nochmals hinterfragt werden.

In Abbildung 18 ist der schematische Aufbau der unterschiedlichen Fusionskonstrukte dargestellt. Die Expressionsvektoren pET-eGFP-RTA_{His}, pET-eGFP-RTA_{His}^{HDEL} sowie pET-eGFP-RTA_{His}^{KDEL} wurden durch die Ligation von eGFP über die Schnittstellen *NheI*/*Bam*HI mit den in Punkt 3.1 konstruierten Vektoren pET-RTA_{His}, pET-RTA_{His}^{HDEL} und pET-RTA_{His}^{KDEL} hergestellt. Die eGFP-Sequenz wurde zuvor mittels PCR (Tabelle 10) aus dem Ausgangsplasmid pCMV-eGFP (Tabelle 5) amplifiziert.

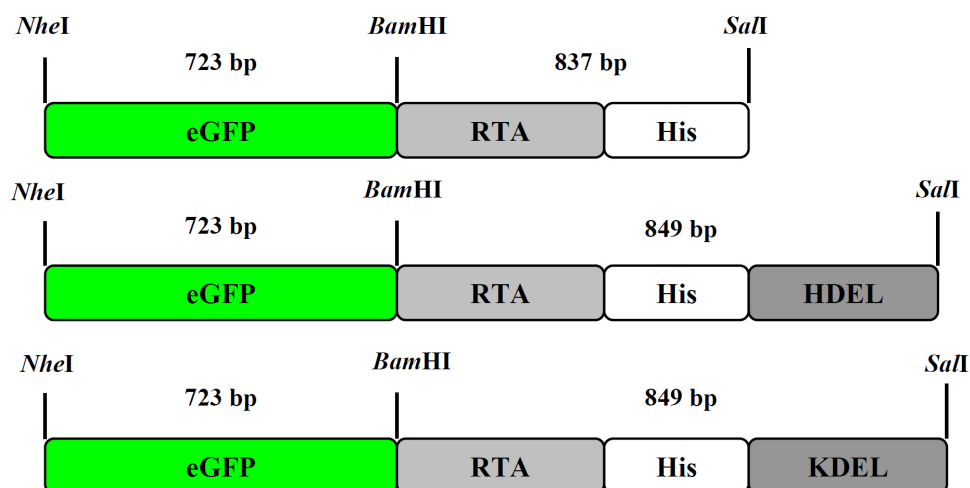


Abbildung 18: Konstrukte zur Expression fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der 5'- bzw. 3'-Enden sowie die Basenzahl der Fusionsproteine sind dargestellt. Die Sequenz von eGFP wurde durch Ligation über die Schnittstellen *NheI*/*Bam*HI an den N-Terminus der Konstrukte RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} fusioniert (Punkt 3.1).

3.2.1 Expression und Reinigung fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten

Die heterologe Expression der fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten fand wiederum in *E. coli* statt. Aufgrund der erfolgreichen Experimente in Punkt 3.1.1 erfolgten die Transformation sowie Expression der Fusionsvarianten unter entsprechenden Bedingungen (3 h, 1 mM IPTG und 20°C). Für die effektive Faltung der ca. 57 kDa schweren Fusionsproteine zu gewährleisten, wurde die Temperatur von 28°C auf 20°C gesenkt. Alle

Fusionen konnten nach Zellaufschluss im *E. coli* Lysat nachgewiesen werden (Abbildung 19C). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen waren fluoreszierende Proteinbanden bei ca. 54 kDa zu erkennen. Die Fusionsbanden liefen unterhalb der erwarteten Größe von ca. 57 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen waren Banden im Bereich von 57 kDa zu sehen (Daten nicht gezeigt). Vermutlich ist der beobachtete Shift auf ein verändertes Laufverhalten der Fusionsproteine bei nicht-reduzierenden Bedingungen zurückzuführen. Anschließend wurden die Zellaufschlüsse durch Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und in PBS pH 7,4 umgepuffert. Die Verifizierung der gereinigten Proben mittels Western-Analyse zeigte, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um die eGFP-RTA-Fusionen handelte. Sowohl der Nachweis durch Anti-RTA-Antikörper als auch die UV-Detektion ergab ein identisches Bandenmuster (Abbildung 19A+B). Die Banden waren ebenfalls bei der Entwicklung mit Anti-GFP-Antikörper zu sehen (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Toxinvarianten war eine geringere Gesamtproteinausbeute der einzelnen Varianten (ca. 20-25 mg/l) zu verzeichnen. Die Reinheit der gereinigten Toxinvarianten entsprach mit 90-95 % etwa den Ergebnissen in Punkt 3.1.1.

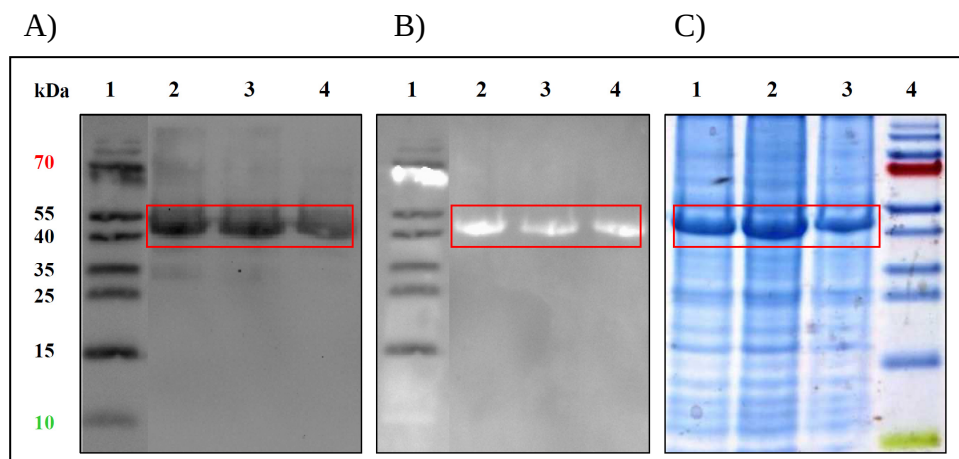


Abbildung 19: Nachweis der Expression und affinitätschromatographischen Reinigung fluoreszenzmarkierter RTA-Varianten in *E. coli* BL21(DE3).

A) Western-Analyse und **B)** UV-Detektion der gereinigten und umgepufferten fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten unter nicht-reduzierenden Bedingungen (20°C und 1 mM IPTG, 3 h Inkubation). Die Detektion in A) erfolgte durch Anti-RTA-Antikörper und HRP-gekoppelte Anti-Sheep-Antikörper. Die rote Umrandung kennzeichnet die Banden der eGFP-RTA-Konstrukte.

- (1) Proteingrößenstandard
- (2) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}]
- (3) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}^{HDEL}]
- (4) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}^{KDEL}]

C) Coomassie-Färbung von *E. coli* Zellysaten nach Expression und Zellaufschluss.

- (1) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}]
- (2) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}^{HDEL}]
- (3) BL21 [pET-eGFP-RTA_{His}^{KDEL}]
- (4) Proteingrößenstandard

Insgesamt konnten somit in der vorliegenden Arbeit ausreichende Mengen fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten exprimiert und gereinigt werden. Trotz der geringeren Gesamtproteinausbeute im Vergleich zu Punkt 3.1 konnten alle weiterführenden Experimente problemlos durchgeführt werden. Zusätzlich konnte sicher gestellt werden, dass es zu keinem Verlust der eGFP-Fluoreszenz während der Reinigung und Umpufferung kam. Dadurch stand der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des RTA-Transports grundsätzlich nichts im Wege. Allerdings musste im weiteren Verlauf noch die biologische Aktivität der unterschiedlichen Konstrukte bestätigt werden.

3.2.2 Nachweis der *in vivo* Toxizität von fluoreszenzmarkierten RTA-Varianten

Für die Analyse der biologischen Aktivität wurden ausschließlich XTT-basierte Toxizitätstests eingesetzt. In Abbildung 20 sind beispielhaft die Zellvitalitäten von HeLa-Zellen nach Behandlung mit fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten graphisch dargestellt.

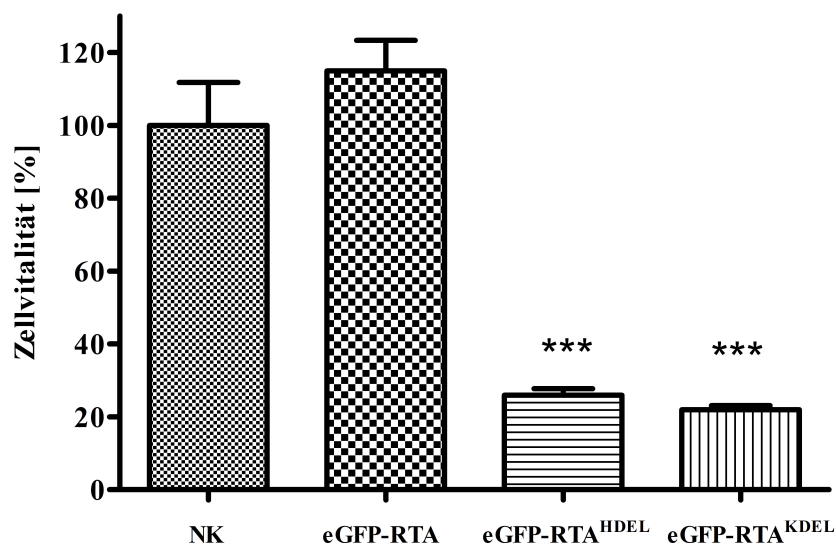


Abbildung 20: Wirkung fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit einer Toxindosis von 160 µg/ml bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Zellvitalität mit Hilfe des XTT-basierten Toxizitätstests bestimmt. Es wurden 3-fach Bestimmungen (n = 3) der Proben durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung und Signifikanz (** = p ≤ 0,01) angegeben. Als Referenz für die Signifikanz dienten die Werte der Negativkontrolle.

Analog zu den vorherigen Toxizitätsuntersuchungen zeigten auch die fluoreszenzmarkierten Varianten eGFP-RTA_{His}^{HDEL} bzw. eGFP-RTA_{His}^{KDEL} eine deutliche Abnahme der Vitalität nach 48 h. Diese entspricht in beiden Fällen ca. 80 %. Zusätzlich konnte wiederum keine toxische Wirkung der eGFP-RTA_{His}-Variante beobachtet werden. Die Daten stimmen im Großen und Ganzen mit den Ergebnissen der nicht-fluoreszenzmarkierten Varianten überein (Punkt 3.1.2). Interessanterweise bestätigen die durchgeführten Toxizitätstests die

Beobachtungen von Wang *et al.* (2010), bei denen auch keinen toxischen Effekt von eGFP-RTA_{His} auf Säugerzellen beobachtet wurde. Daher stellt sich die Frage, wodurch die Toxizität bei den von Lui *et al.* (2006) präsentierten Ergebnissen vermittelt wurde. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit der Grundstein für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Aufnahme der Toxinvarianten gelegt werden.

3.2.3 Untersuchungen zur Toxinaufnahme und Kolokalisation mit Erd23

Vor den eigentlichen Untersuchungen zur Toxinaufnahme und -kolokalisation wurde das Expressionsmuster eines fluoreszenzmarkierten Erd23-Rezeptors näher analysiert. Hierzu wurde das Plasmid pmCherry-N1-Erd2.3-mCherry verwendet (Punkt 2.2.2). Neben Erd21 und Erd22 ist Erd23 einer von drei identifizierten KDEL-Rezeptoren in Säugerzellen. Die Aufgabe der KDEL-Rezeptoren besteht darin, ER-residente Proteine im ER zurückzuhalten oder diese dorthin zurück zu transportieren (Townsend *et al.*, 1993). Die Rezeptoren sind dabei in der Lage eine Vielzahl von KDEL- ähnlichen Motiven zu erkennen, wobei jeder einzelne unterschiedliche Spezifität besitzt. Erd23 beispielsweise hat eine deutlich höhere Affinität zu HDEL- als zu KDEL-Motiven (Raykhel *et al.*, 2007). Die Expression eines ebenfalls mit mCherry fusionierten Erd22-Rezeptor konnte bereits erfolgreich durchgeführt werden (Klein, 2009). Das beobachtete Expressionsmuster unterschied sich dabei nicht wesentlich vom natürlichen (Klein, 2009 und Raykhel *et al.*, 2007). Zur Überprüfung der Fluoreszenz-Verteilung wurden HeLa-Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Erd23-Rezeptor transfiziert und unterm CLSM analysiert (Abbildung 21). In den Zellen war ein ringförmiges, teilweise punktuell Fluoreszenzmuster um den Zellkern zu erkennen. Die Verteilung deutet auf eine Lokalisation im Bereich des angrenzenden ERs bzw. TGNs hin und entspricht in etwa der natürlichen Proteinverteilung (Raykhel *et al.*, 2007). Somit konnte der fluoreszenzmarkierte Erd23-Rezeptor erfolgreich in HeLa-Zellen exprimiert werden. Aufgrund der starken Ähnlichkeiten zum wildtypischen Expressionsmuster scheint das Fluoreszenzprotein auch keinen negativen Einfluss auf die Proteinlokalisierung zu haben.

mcherry-Fluoreszenz
+ DAPI

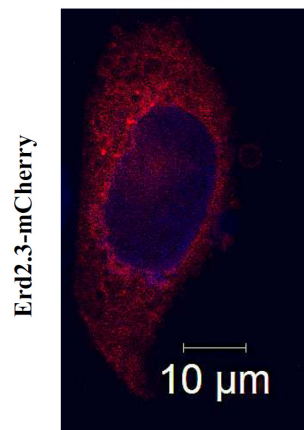


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Expressionsmusters von pmCherry-N1-Erd2.3-mCherry in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmid-DNA (1 µg) transfiziert und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach DAPI-Färbung wurden die Zellen im CLSM analysiert (63-fache Vergrößerung; Messbalken: 10 µm; Mikroskop: CLSM 510 Meta (Zeiss); average: 4; Laser 543: 4,1 %; Laser 720: 21,8 %; die Anregung mit 358 nm wurde durch den Zweiphotonen-Laser „Chameleon“ erzielt (720 nm)).

Im Nachfolgenden wurden überprüft, ob die gesteigerte *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA_{His}^{HDEL} möglicherweise auf der Beteiligung des Erd23-Rezeptors am Toxintransport beruht. Die Vermutung liegt nahe, dass die Toxinvarianten mit zusätzlichem ER-Retentionssignal an den Rezeptor binden und somit effektiver retrograd in das Zytosol transportiert werden. Um die Fragestellung genauer zu adressieren und erste Hinweise für die Theorie zu erhalten, wurden HeLa-Zellen mit pmCherry-N1-Erd2.3-mCherry transfiziert, nach 24 h mit den verschiedenen Toxinvarianten behandelt und anschließend die Kolokalisation von fluoreszenzmarkiertem Rezeptor und RTA am CLSM analysiert (Punkt 2.20.3). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 h mit Toxin behandelt, da in BHK21-Zellen die Endozytose von Ricin innerhalb von 60 min erfolgen kann und der Toxinnachweis im Golgi-Kompartiment nach ca. 2 h möglich ist (Van Deurs *et al.*, 1988). Zudem konnte Wales *et al.* (1993) bestätigen, dass die Proteinbiosyntheserate von Vero-Zellen nach Behandlung mit RTA^{KDEL} nach 3 h bei ca. 10 % lag. Die Auswertung der CLSM-Aufnahmen ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Expression des fluoreszenzmarkierten Erd23-Rezeptors war in allen Ansätzen zu beobachten. Diese war wie bereits zuvor gezeigt hauptsächlich in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert und teilweise waren punktuelle Strukturen zu erkennen. Bei denen mit der Negativkontrolle behandelten HeLa-Zellen waren erwartungsgemäß keine GFP-Signale zu sehen, wohingegen bei der Behandlung mit eGFP-RTA_{His} punktuelle Signale außerhalb der Zellen sichtbar waren.

Aufgrund dieser Beobachtung und der nur schwachen Toxizität bei hohen Toxindosen kann davon ausgegangen werden, dass eGFP-RTA_{His} wenn überhaupt in extrem geringen Maß von den Säugierzellen aufgenommen wird. Wider Erwarten waren trotz der starken biologischen Aktivität von eGFP-RTA_{His}^{KDEL} (Punkt 3.2.2) auch dort nur extrazelluläre GFP-Signale in HeLa-Zellen zu beobachten. Auch in Wiederholungsexperimenten konnten keine intrazellulären Signale für eGFP-RTA_{His}^{KDEL} detektiert werden. Interessanterweise konnten hingegen nach der Behandlung mit eGFP-RTA_{His}^{HDEL} Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellen nachgewiesen werden. Grundsätzlich waren Signale sowohl im Bereich der Plasmamembran als auch in der Peripherie des Zellkerns zu erkennen. Zusätzlich konnten vereinzelt orange-gelbe Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Dabei handelt es sich um Kolo-kalisationen zwischen GFP-markiertem Toxin und mCherry-markiertem Rezeptor. Dies wurde anschließend durch die Analyse der Intensitätsprofile bestätigt (Abbildung 23). Zugleich spricht die Kolo-kalisation für den retrograden Transport von RTA_{His}^{HDEL} bis in das ER und die biologische Aktivität für die abschließende Retrotranslokation in das Zytosol.

Um sicher zu stellen, dass die beobachteten Fluoreszenzsignale zumindest teilweise innerhalb der Zellen liegen, wurden die Plasmamembran nach Behandlung mit fluoreszenzmarkiertem eGFP-RTA_{His}^{HDEL} mit Hilfe von Rhodamin-gelabelten *Ricinus communis* Agglutinin (RCA) angefärbt und im CLSM analysiert. RCA ist dabei in der Lage, spezifisch an Galaktose-Strukturen auf der Plasmamembran-Oberfläche zu binden (Roth *et al.*, 1978). In Abbildung 24 ist beispielhaft der intrazelluläre Nachweis von eGFP-RTA_{His}^{HDEL} nach 4 h dargestellt. Dabei war beim Großteil der Zellen GFP-Fluoreszenzsignale im Bereich der Plasmamembran zu erkennen, die zumindest auf eine Bindung an die Plasmamembran hindeuten (Abbildung 24A). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Anlagerung des fluoreszenzmarkierte eGFP-RTA_{His}^{HDEL} nur an bestimmten Regionen der Plasmamembran erfolgt (siehe weiße Pfeile Abbildung 24A). In einzelnen Zellen konnten zusätzliche einzelne GFP-Signale in der Nähe des Zellkerns detektiert werden (weiße Pfeile, Abbildung 24B), die vollkommend von der Plasmamembran umschlossen waren. Dabei handelt es sich eventuell um Ansammlungen von endozytierten eGFP-RTA_{His}^{HDEL}-Molekülen innerhalb der Zelle.

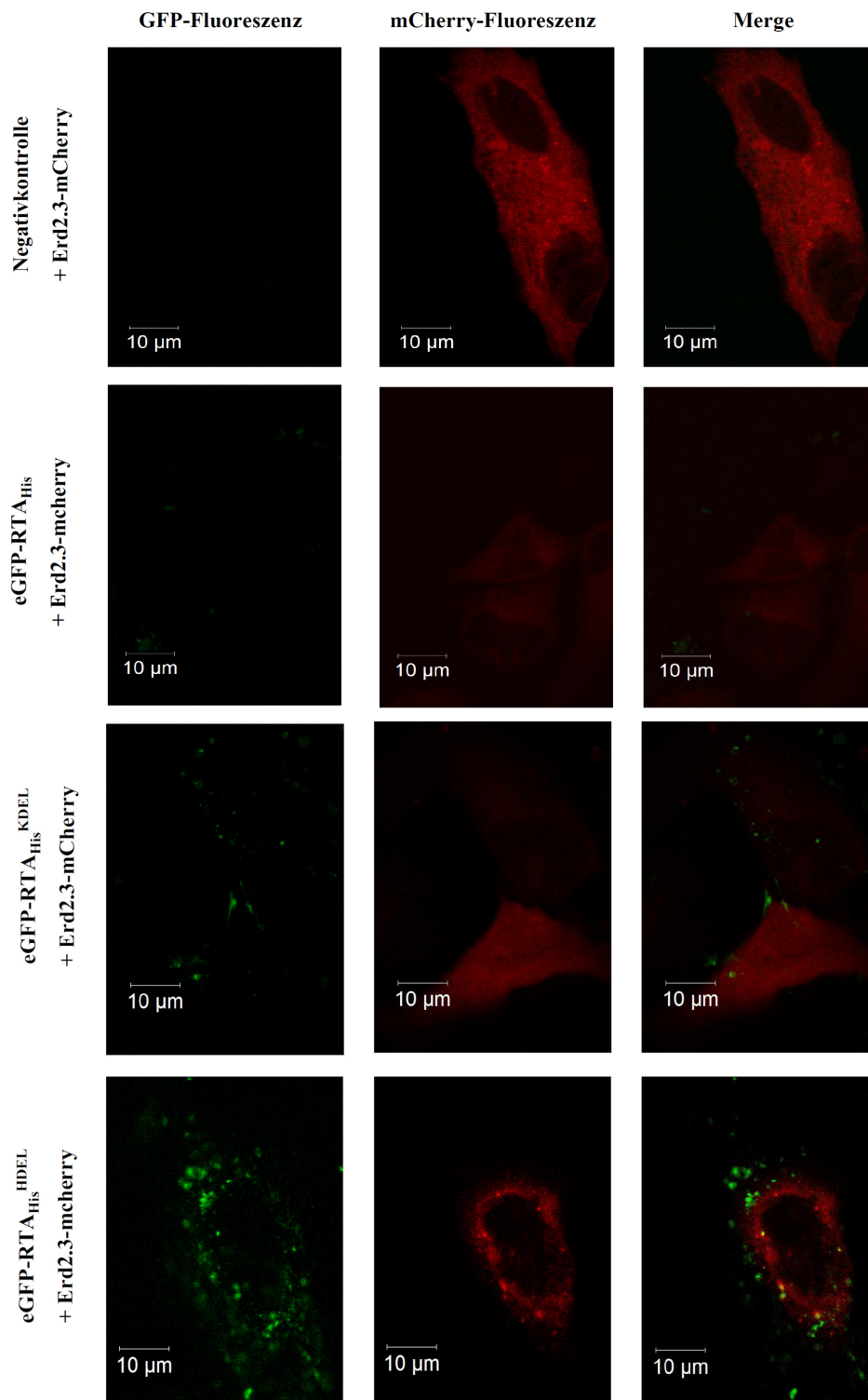


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolo-kalisation von Erd23-mCherry mit den entsprechenden eGFP-Toxinvarianten in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h mit den unterschiedlichen, gereinigten Toxinvarianten (160 µg/ml) behandelt und im CLSM analysiert (100-fache Vergrößerung; Messbalken: 10 µm; Mikroskop: CLSM 510 Meta (Zeiss); average: 4; Laser 543: 4,1 %; Laser 488: 4,1 %). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem gereinigtem Zelllysate von BL21 [pET24a⁽⁺⁾] behandelt wurden.

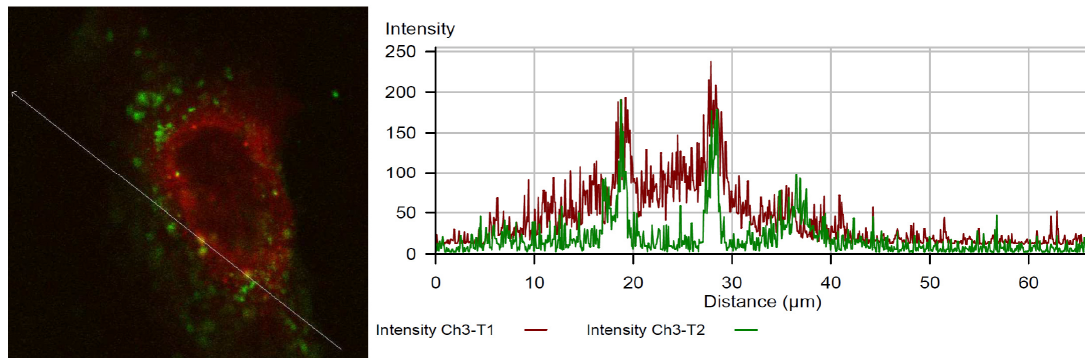


Abbildung 23: Nachweis der Kolokalisation von Erd23-mcherry und eGFP-RTA_{His}^{HDEL} in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h mit 160 µg/ml eGFP-RTA_{His}^{HDEL} behandelt und im CLSM analysiert (100-fache Vergrößerung; average: 4; Laser 543: 4,1 %; Laser 488: 4,1 %). Das Intensitätsprofil (rechts) wurde mit der Software „Zeiss LSM Image Examiner“ erstellt.

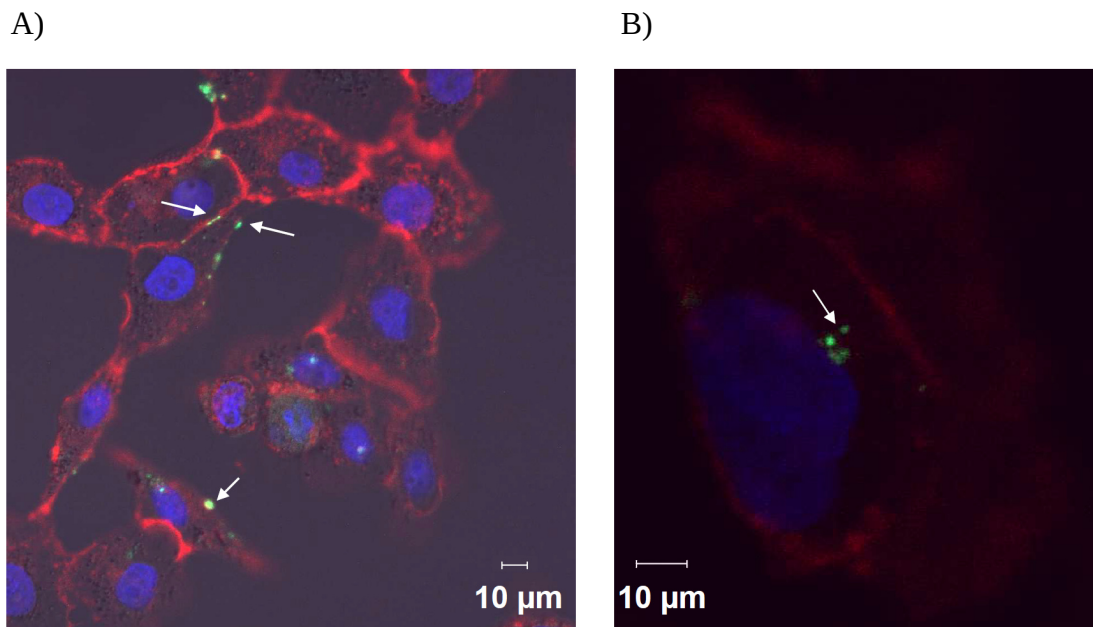


Abbildung 24: Nachweis der Toxinaufnahme von eGFP-RTA_{His}^{HDEL} in HeLa-Zellen. 4 x 10⁵ Zellen wurden in 24er Wells ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 160 µg/ml eGFP-RTA_{His}^{HDEL} über einen Zeitraum von 4 h behandelt, anschließend zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die Plasmamembran mit Rhodamin-gelabelten RCA 10 min angefärbt. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden die Zellen 20 min bei RT fixiert, abschließend die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Punkt 2.20.3) und im CLSM analysiert. Die weißen Pfeile kennzeichnen eGFP-RTA_{His}^{HDEL}. **A)** 63-fache Vergrößerung; average: 4; Laser 514: 3,1 %; Laser 543: 6,1 %; Laser 488: 3,1 %; Laser 720: 28,7 %. **B)** 63-fache Vergrößerung; average: 2; Zoom 2; Laser 543: 6,1 %; Laser 488: 3,1 %; Laser 720: 28,7 %.

Zusammenfassend konnte somit in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich eGFP-RTA_{His}^{HDEL} an spezifische Regionen der Plasmamembran anlagern und zumindest teilweise von HeLa-Zellen endozytiert wird. Damit konnte im Gegensatz zu der Western-Analyse die Aufnahme von eGFP-RTA_{His}^{HDEL} bestätigt werden. Auch durch die *in vivo* Toxizität von eGFP-RTA_{His}^{HDEL} konnte indirekt die Toxinaufnahme sowie der retrograde

Transport in das Zytosol belegt werden. Parallel dazu deutet die Überlagerung der GFP- und mCherry-Fluoreszenzen auf eine räumliche Nähe zwischen dem Erd23-Rezeptor und RTA_{His}^{HDEL} im ER hin. Die Intensitätsprofile untermauern zusätzlich diese Kolo-kalisation. Die beiden Ergebnisse lassen auf eine mögliche Interaktion zwischen Toxin und Erd23-Rezeptor schließen. Das Ausbleiben intrazellulärer Fluoreszenzsignale bei eGFP-RTA_{His} weist auf eine geringe Endozytose hin und deckt sich mit den Ergebnissen zur biologischen Aktivität. Die Endozytose von eGFP-RTA_{His}^{KDEL} sowie dessen Kolo-kalisation mit Erd23 konnte jedoch nicht gezeigt werden, obwohl aufgrund der biologischen Aktivität zumindest eine Internalisierung der Toxinvariante stattfinden sollte. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass prinzipiell die Analyse von Endozytose und intrazellulärem Transports von RTA mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten an lebenden Zellen verfolgt werden kann. Zudem erhärten die Ergebnisse von eGFP-RTA_{His}^{HDEL} die Vermutung, dass die KDEL-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der gesteigerten *in vivo* Toxizität von RTA^{HDEL} bzw. RTA^{KDEL} in Säugerzellen spielen.

3.3 Intrazelluläre Expression von RTA-Varianten in Säugerzellen

Nachdem in Punkt 3.1 die *in vivo* Toxizität von extrazellulär applizierten RTA-Varianten in HeLa und HEK293T-Zellen untersucht wurde, sollte im Folgenden die intrazelluläre Expression verschiedener RTA-Konstrukte im Säuger und deren Auswirkungen auf die Zellvitalität näher charakterisiert werden. Interessanterweise wird auch in Hefen die Proteinbiosynthese nach intrazellulärer Expression von RTA inhibiert (Pierce *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Tatsache konnte in Hefen ein Modell entwickelt werden, um die ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA näher zu untersuchen (Li *et al.*, 2011a; Simpson *et al.*, 1999). Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Grundlagen geschaffen werden, um ein analoges Modell zur ER-Zytosol-Retrotranslokation im Säuger zu etablieren. Zusätzlich sollten die Untersuchungen zeigen, inwieweit sich die *in vivo* Toxizität nach intrazellulärer Expression verschiedener RTA-Varianten in Hefe- bzw. Säugerzellen unterscheidet bzw. gleicht.

Um die toxische Wirkung im Säuger zu analysieren, wurden zunächst analog zu den Hefe-Untersuchungen von Schnöder (2009) verschiedene RTA-Varianten mit bzw. ohne ER-Importsignal hergestellt (Abbildung 25). Zur zytosolischen Expression wurden RTA-Varianten ohne Signalsequenz hergestellt. Diese wurden mit Hilfe den entsprechenden Primern (Tabelle 10) aus den Ausgangsplasmiden pRS316-Kar2_{SP}-RTA bzw. pJC2433gem-pre_RTAdelta amplifiziert und anschließend über die vorhandenen Restriktionsschnittstellen *EcoRI/NotI* in den pmCherry-N1-Vektor eingebracht. Durch die Primer wurde zusätzlich vor

dem Start-Kodon eine Kozak-Sequenz angefügt, wodurch die spätere Erkennung der mRNA durch das Ribosom verbessert wird (Kozak, 1986). Die Klonierung der Varianten mit zusätzlichem ER-Importsignal erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die RTA-Sequenzen mittels PCR (Tabelle 10) amplifiziert und analog zu den zytosolischen Varianten in pmCherry-N1 einkloniert. Anschließend wurde die ER-Signalsequenz (Tabelle 10) aus dem Ausgangsplasmid pCA38-PPL hergestellt und über die Restriktionsschnittstellen *NheI/EcoRI* in die Vektoren pmCherry-RTA bzw. pmCherry-RTA^{E177D} ligiert. Die Signalsequenz von Präprolactin soll dabei einen effektiven, cotranslationalen Import in das ER gewährleisten (Fehrmann *et al.*, 2003). Nachdem die Herstellung der Konstrukte abgeschlossen war, wurde zunächst die Transfektion für HeLa- bzw. HEK293T-Zellen etabliert, um eine möglichst effiziente und reproduzierbare Plasmid-Transfektion zu erzielen.

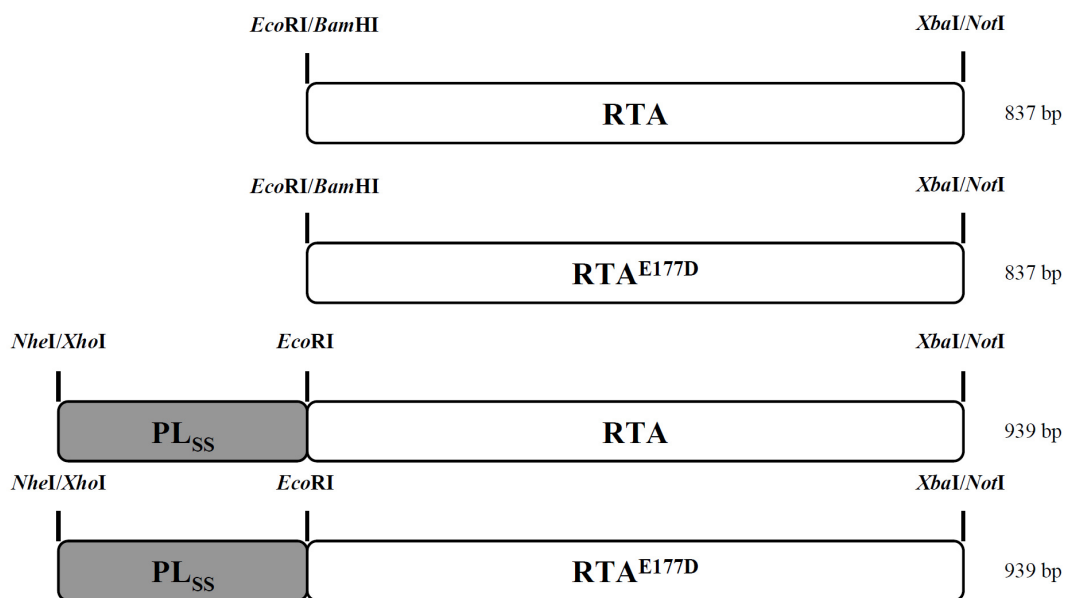


Abbildung 25: Konstrukte zur intrazellulären Expression von RTA in HeLa-Zellen. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der 5'- bzw. 3'-Enden sowie die Basenanzahl der Konstrukte sind dargestellt. Die RTA-Sequenzen wurden durch *EcoRI/NotI*-Restriktion in den Expressionsvektor pmCherry-N1 eingebracht (Punkt 2.2.3.2). Bei den Konstrukten mit zusätzlicher Präprolactin-Signalsequenz (PL_{SS}) enthalten die RTA-Sequenzen kein Start-Kodon. Die Signalsequenzen wurden in einer zweiten Ligation über die Schnittstellen *NheI/EcoRI* in die Plasmide pmCherry-RTA bzw. pmCherry-RTA^{E177D} eingebracht.

3.3.1 Etablierung und Optimierung des Transfektionssystems

Zur Etablierung der Transfektion wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die Transfektionsraten treffen zu können. Die Identifizierung plasmidtragender Zellen erfolgte mit Hilfe des Reporterplasmits pAcGGSM2-IRES-GFP (Tabelle 6). Nach erfolgter Transfektion kommt es zur Expression von GFP, wodurch die

Zellen nach Anregung grün fluoreszieren und von untransfizierten unterschieden werden können. Bei den Optimierungsexperimenten wurden die Parameter hinsichtlich Zellzahl (5×10^4 , 1×10^5 und 2×10^5), Transfektionsreagenz (Nanofectin und PolyFect) und eingesetzter Plasmid-DNA-Menge (0,5 µg bis 1 µg) variiert. Die Transfektion der Zellen wurde parallel unter den unterschiedlichen Bedingungen im 24-Well Maßstab durchgeführt (Punkt 2.8.3) und anschließend die GFP-Fluoreszenz von 10.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bei der Transfektion mit PolyFect konnten keine zufriedenstellenden Transfektionsraten erzielt werden. Bei beiden Zelllinien lagen diese maximal bei 30 % (Daten nicht gezeigt). Nach Transfektion mit Nanofectin hingegen waren deutlich höhere Effizienzen zu beobachten. Bei HeLa-Zellen erbrachte die Kombination aus Nanofectin, 1×10^5 Zellen und 1 µg Plasmid-DNA die besten Transfektionsergebnisse. Unter diesen Bedingungen konnten reproduzierbare Effizienzen von 65-70 % erzielt werden. Ähnliche Transfektionsraten (60-65 %) konnten auch bei HEK293T-Zellen erreicht werden. Im Vergleich zu HeLa-Zellen waren die optimalen Transfektionsbedingungen bei HEK293T-Zellen leicht verändert (Nanofectin, 1×10^5 Zellen und 0,5 µg Plasmid-DNA). Aufgrund der etwas höheren Transfektionsraten wurde in der vorliegenden Arbeit die HeLa-Zelllinie für die weiteren Untersuchungen zur intrazellulären Expression eingesetzt. In Tabelle 13 sind die optimalen Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 13: Übersicht über die optimalen Transfektionsbedingungen und die daraus resultierenden Transfektionsraten von HeLa- und HEK293T-Zellen.

Zelllinie	Reagenz	Well	Plasmid-DNA [µg]	Zellzahl	Transfektionsrate
HeLa S3	Nanofectin	24	1	1×10^5	65- 70%
HEK293T	Nanofectin	24	0,5	1×10^5	60-65 %

3.3.2 Nachweis der *in vivo* Toxizität in HeLa-Zellen

Nach der Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde die *in vivo* Toxizität der Toxinvarianten bestimmt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden transfiziert und deren Zellvitalität mittels XTT-basierten Toxizitätstests nach 24 h analysiert. In Abbildung 26 ist beispielhaft eine Auswertung der Zellvitalitäten dargestellt. Zwar verursachten die zytosolische exprimierten Konstrukte pmCherry-RTA bzw. pmCherry-RTA^{E177D} einer tendenziellen Abnahme der Zellvitalität,

jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle beobachtet werden. Bei den Varianten pmCherry-PL_{SS}-RTA und pmCherry-PL_{SS}-RTA^{E177D} konnte hingegen eine deutliche Reduzierung der Zellvitalität von ca. 80 % bzw. 70 % beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur etwa 60-70 % der Zellen das Plasmid aufgenommen haben, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression einen letalen Effekt in HeLa-Zellen auslöst. Um sicher zu stellen, dass die fehlende Toxizität der zytosolischen wildtypischen RTA-Variante nicht durch eine fehlende Expression hervorgerufen wurde, wurde die Proteinexpression im Nachfolgenden mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

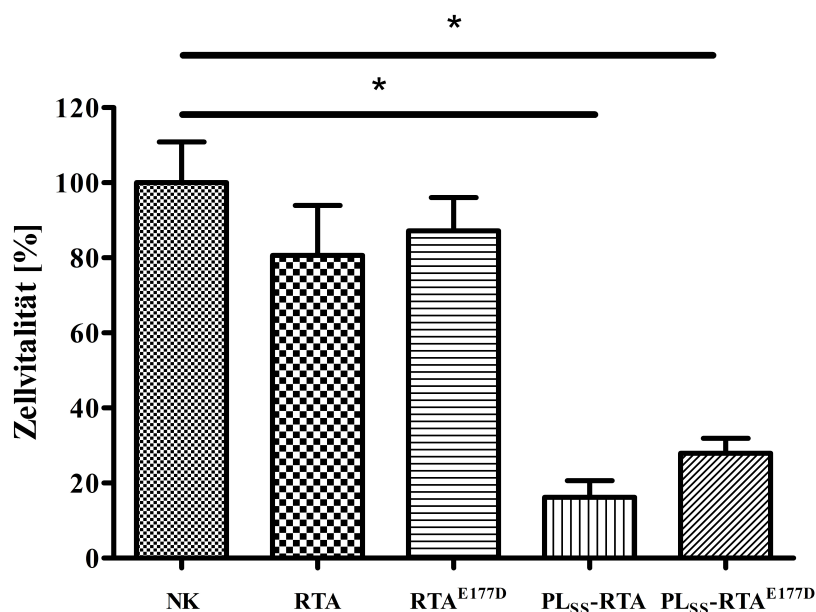


Abbildung 26: Auswirkungen einer intrazellulären Expression verschiedener RTA-Varianten auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit jeweils 1 µg der verschiedenen Plasmide sowie der Negativkontrolle transfiziert und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels XTT-basierten Toxizitätstests bestimmt. Bei der Negativkontrolle (NK) handelt es sich um pmCherry-N1 (Punkt 2.2.3.2). Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung und Signifikanz (* = $p \leq 0,05$) angegeben. Als Referenz für die Signifikanz dienten die Werte der Negativkontrolle.

3.3.3 Nachweis der intrazellulären Expression von RTA mittels Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wird häufig zur Proteinlokalisierung und -nachweis eingesetzt (Wheatley und Wang, 1998). Ähnlich wie bei der Western-Analyse erfolgte die Detektion von RTA mit Hilfe des Anti-RTA Antikörpers. An diesen wurde anschließend ein FITC-markierter sekundärer Antikörper gekoppelt (Punkt 2.3.1). Zuletzt wurde die Lokalisation von RTA durch Fluoreszenzmikroskopie verifiziert. In der vorliegenden Arbeit

wurden die indirekte Immunfluoreszenz an HeLa-Zellen nach dem in Punkt 2.19 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die in Abbildung 27 dargestellten Fluoreszenzbilder bestätigen, dass sowohl die zytosolischen Varianten als auch die Varianten mit Signalsequenz intrazellulär exprimiert wurden.

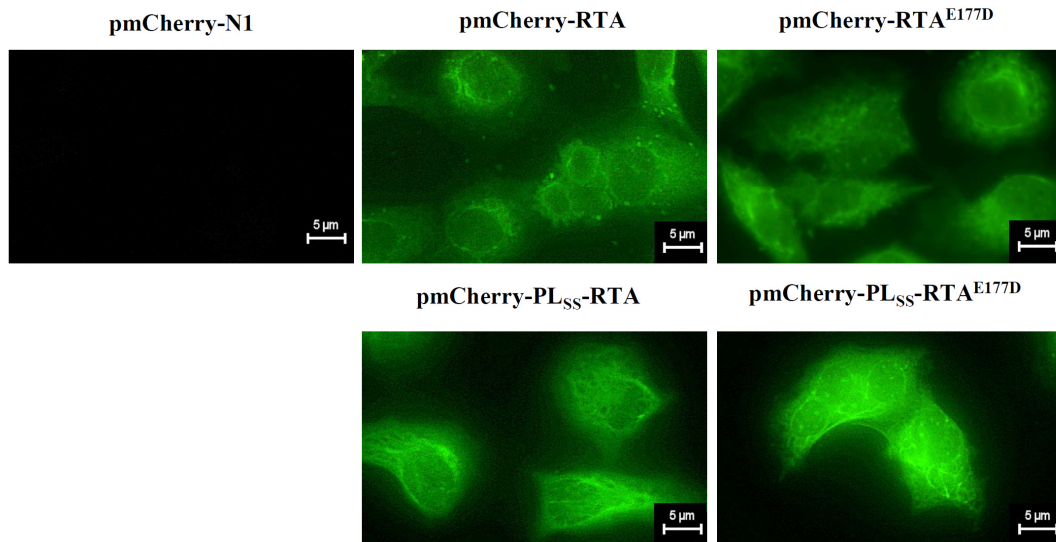


Abbildung 27: Nachweis der Proteinexpression und -lokalisierung verschiedener RTA-Varianten in HeLa-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dem Protokoll von Punkt 2.19 behandelt und zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. (50-fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; Mikroskop: Biozero BZ-8000; Belichtungszeit: 1/45 s). Bei der Negativkontrolle handelt es sich um den Grundvektor pmCherry-N1 (Punkt 2.2.3.2).

Nach Transfektion mit dem Leervektor pmCherry-N1 konnten hingegen keine Fluoreszenzen innerhalb der Zellen beobachtet werden. Die Zellen, die mit den zytosolischen Varianten pmCherry-RTA bzw. pmCherry-RTA^{E177D} transfiziert wurden, zeigten starke Fluoreszenzsignale. Dadurch kann eine fehlende Expression als Grund für Toxizitätsunterschiede zwischen den zytosolischen Varianten und der mit ER-Signalsequenz ausgeschlossen werden. Auch in denen mit pmCherry-PL_{SS}-RTA bzw. pmCherry-PL_{SS}-RTA^{E177D} transfizierten Zellen waren starke Signale zu erkennen. Jedoch waren keine Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzverteilung zu sehen. In den jeweiligen Ansätzen waren sowohl diffuse Signale im Zytosol als auch ringförmige, netzwerkartige Strukturen um den Zellkern zu erkennen, die möglicherweise auf eine ER-Lokalisation hindeuten. Insgesamt haben die Untersuchungen gezeigt, dass die zytosolische Expression von RTA eine geringere *in vivo* Toxizität als die Toxinvarianten mit ER-Signalpeptid in Säugerzellen induziert. Die Verstärkung der *in vivo* Toxizität von PL_{SS}-RTA bzw. PL_{SS}-RTA^{E177D} deutet zusätzlich darauf hin, dass RTA nach dem ER-Import und der Translokation in das Zytosol eine stärkere enzymatische Aktivität als die zytosolische Variante aufweist. Zudem konnten grundlegende

Voraussetzungen für die Etablierung eines Modells zur Untersuchung der ER-Zytosol-Retrotranslokation im Säuger geschaffen werden. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit die Transfektion dahingehend optimiert werden, dass die jeweiligen RTA-Expressionsplasmide nun effizient in HeLa- und HEK293T-Zellen eingebracht werden können.

3.4 Auswirkung des Sec61 α -Knockdowns auf die Toxizität von RTA

Im letzten Teil der säugerspezifischen Untersuchungen sollte hinterfragt werden, inwieweit das Sec61-Translokon an der Retrotranslokation von RTA_{His}^{HDEL} bzw. RTA_{His}^{KDEL} beteiligt ist. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob die katalytische Domäne von Ricin durch das Sec61-Translokon aus dem ER in das Zytosol transportiert wird. Wesche *et al.* (1999) konnten zwar eine Interaktion zwischen RTA und Sec61 α beobachten, jedoch hatte der siRNA-Knockdown der einzelnen Sec61-Komponenten keinen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von Ricin in Säugierzellen (Moreau *et al.*, 2011). Auch die Retrotranslokation von RTA^{KDEL} wurde diesbezüglich nicht genauer untersucht. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Sec61-Translokons an der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA_{His}^{HDEL} zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die RNA-Interferenz-Technologie eingesetzt. Durch die Verwendung spezifischer siRNAs kann dabei die mRNA des gewünschten Zielgens abgebaut und somit deren Genexpression verhindert werden.

3.4.1 Einfluss der Sec61 α -Depletion auf die Toxizität der RTA-Varianten

Zunächst wurde untersucht, welche Folgen ein Verlust von funktionellem Sec61 α auf die *in vivo* Toxizität rekombinanter RTA-Varianten hat. Um eine effektive Depletion von Sec61 α zu erzielen, wurde ein etabliertes Sec61 α -Knockdown-Protokoll der Arbeitsgruppe Zimmermann (Universität des Saarlandes, Homburg) an die Fragestellung der vorliegenden Arbeit angepasst (Punkt 2.16). Die Durchführung aller Knockdown-Experimente erfolgte ebenfalls in der Arbeitsgruppe Zimmermann in Zusammenarbeit mit Nico Schäuble.

Hierzu wurden HeLa-Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit ctrl-siRNA oder Sec61_{A1}-siRNA (20 nM) transfiziert. Die ctrl-siRNA diente hierbei als Kontrolle, da sie keine Homologien zu humanen Sequenzen besitzt und somit mögliche unspezifische Effekte der Transfektion ausgeschlossen werden können. Die eingesetzte Sec61_{A1}-siRNA (Punkt 2.3.2) ist hingegen in der Lage innerhalb des 5'-UTR-Bereiches der Sec61 α -mRNA zu binden, wodurch der spezifische Abbau der mRNA vermittelt wird (Lang *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden noch untransfizierte Zellen mitgeführt, um negative Effekte der Transfektion zu

detektieren. Zur Steigerung der Knockdown-Effizienz wurden die Zellen nach 24 h erneut transfiziert. Die Zugabe der in Punkt 3.1 hergestellten RTA-Varianten bzw. der Negativkontrolle zu den Sec61 α -depletierten Zellen sowie den Kontrollen (ctrl-siRNA und untransfizierte Zellen) erfolgte nach 96 h. Nach insgesamt 120 h wurde die Zellvitalität mittels WST-1-basierten Vitalitätstests bestimmt (Punkt 2.15.3). Der Vitalitätstest basiert auf einer enzymatischen Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zu einem dunkelroten Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen. Der Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden (Francoeur und Assalian, 1996). Die Absorption wurde alle 10 min über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Die Menge an gebildeten Formazan korreliert dabei mit der Anzahl an vitalen Zellen und ist somit indirekt ein Maß für die Toxizität. Die Zellvitalitäten der Sec61 α -„gesilenceten“ Zellen wurden im Anschluss in Relation zu den ctrl-siRNA behandelten Zellen bzw. untransfizierten Zellen gesetzt. Der schematische Versuchsablauf ist in Abbildung 28 graphisch zusammengefasst.

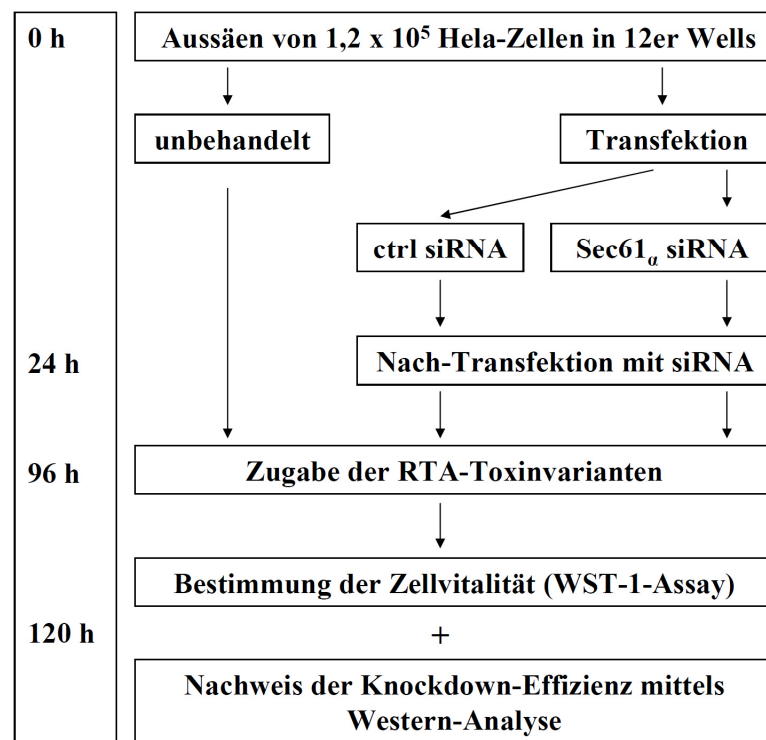


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Sec61 α -Knockdown-Experimente. $1,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden mit ctrl- bzw. Sec61 α -siRNA (20 nM) transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Zusätzlich wurden untransfizierte Zellen mitgeführt, um etwaige negative Effekte der Transfektion auszuschließen. Die Zugabe der entsprechenden RTA-Varianten bzw. der Negativkontrolle erfolgte nach 96 h. Nach weiteren 24 h wurden sowohl die Zellvitalität als auch die Zellzahl der einzelnen Ansätze bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) durchgeführt und deren Mittelwerte ermittelt. Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und abschließend der Sec61 α -Proteingehalt im Western-Blot analysiert (Tabelle 7).

Nach Behandlung mit RTA_{His} konnte keine Veränderung der Zellvitalität von HeLa-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis des WST-1-Vitalitätstests deckt sich somit mit den Untersuchungen aus Punkt 3.1.2, in denen auch keine Toxizität auf HeLa-Zellen mittels XTT-basierten Toxizitätstests nachweisbar war. Unter den Voraussetzungen war es nicht möglich die Auswirkung der Sec61 α -Depletion auf die Toxizität von RTA_{His} zu analysieren.

Im Gegensatz dazu wurde nach Behandlung mit RTA_{His}^{KDEL} die Zellvitalität von untransfizierten und mit ctrl-siRNA transfizierten HeLa-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 29).

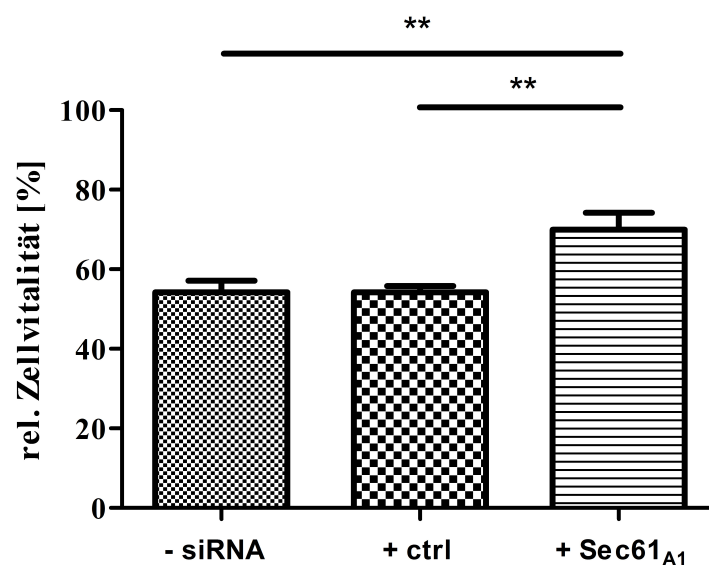


Abbildung 29: Einfluss des Sec61 α -Knockdowns auf die *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{KDEL} in HeLa-Zellen. 1,2 x 10⁵ Zellen wurden mit ctrl- bzw. Sec61_{A1}-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Die Zugabe von RTA_{His}^{KDEL} (160 μ g/ml) erfolgte nach 96 h. Nach weiteren 24 h wurde die Zellvitalitäten mittels WST-1-Vitalitätstests bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen und Signifikanz (** = p $\leq$ 0,01) dargestellt. Die Zellvitalitäten wurden in Relation zu den mit Negativkontrolle-behandelten Zellen gesetzt.

Die Zellen beider Ansätze zeigten eine durchschnittliche Zellvitalität von ca. 54 %. Interessanterweise war eine Verringerung der toxischen Wirkung von RTA_{His}^{KDEL} in Sec61_{A1}-siRNA transfizierten HeLa-Zellen zu erkennen. Die Zellvitalität stieg signifikant um ca. 16 % auf 70 %. Die Resultate deuten darauf hin, dass der Knockdown von Sec61 α in HeLa-Zellen eine protektive Wirkung gegenüber RTA_{His}^{KDEL} verursacht. Dennoch war bei Sec61 α -„gesilenceten“ HeLa-Zellen nach Toxinbehandlung eine geringere Zellvitalität als bei den mit Negativkontrolle-behandelten Zellen zu erkennen (100 %). Bei der Bestimmung der Zellvitalitäten von Sec61_{A1}-siRNA transfizierten Zellen konnte eine signifikante Abnahme der Zellvitalität um ca. 18 % verglichen zu untransfizierten bzw. ctrl-siRNA transfizierten

Zellen beobachtet werden. Der Verlust von Sec61 α selbst ruft daher eine toxische Wirkung in HeLa-Zellen hervor (Abbildung 30).

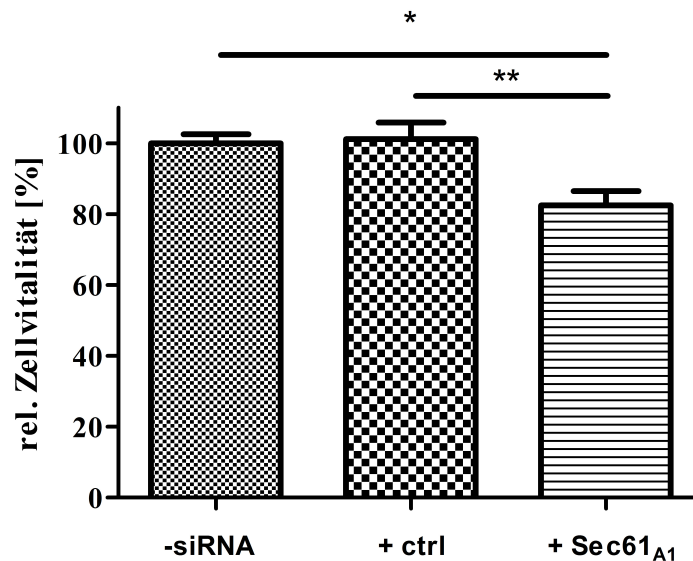


Abbildung 30: Auswirkungen der siRNA-Behandlung auf die Zellvitalität von HeLa-Zellen. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit ctrl- bzw. Sec61_{A1}-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Die Zugabe von Negativkontrolle (160 μ g/ml) erfolgte nach 96 h. Nach weiteren 24 h wurden die Zellvitalitäten mittels WST-1-Vitalitätstests bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen und Signifikanz (** = $p \leq 0,01$) dargestellt. Die Zellvitalitäten wurden in Relation zu den mit Negativkontrolle-behandelten Zellen der jeweiligen Ansätze gesetzt.

Auch bei der Inkubation mit RTA_{His}^{HDEL} wurde ein ähnlicher protektiver Effekt durch das Sec61 α -„Silencing“ in HeLa-Zellen induziert (Abbildung 31). Nach der Toxinbehandlung war eine signifikante Erhöhung der Zellvitalität in Sec61_{A1}-siRNA transfizierten Zellen (92 %) gegenüber untransfizierten Zellen (71 %) sichtbar. Die Zellvitalität von ctrl-siRNA transfizierten Zellen lag bei 83 % und war im Verhältnis zu untransfizierten Zellen leicht erhöht, weshalb kein signifikanter Unterschied zu den Sec61 α -„gesilenceten“ Zellen bestand ($p = 0,069$). Tendenziell scheinen aber auch ctrl-siRNA behandelte Zellen sensitiver auf die Behandlung mit RTA_{His}^{HDEL} zu reagieren. Während bei den XTT-basierten Toxizitätstests kein Unterschied in der Zellvitalität zu erkennen war (Punkt 3.1.2), deuten die Resultate der WST-1-Messungen von untransfizierten Zellen möglicherweise auf einen schwachen Unterschied zwischen RTA_{His}^{HDEL} (71 %) und RTA_{His}^{KDEL} (54 %) hin.

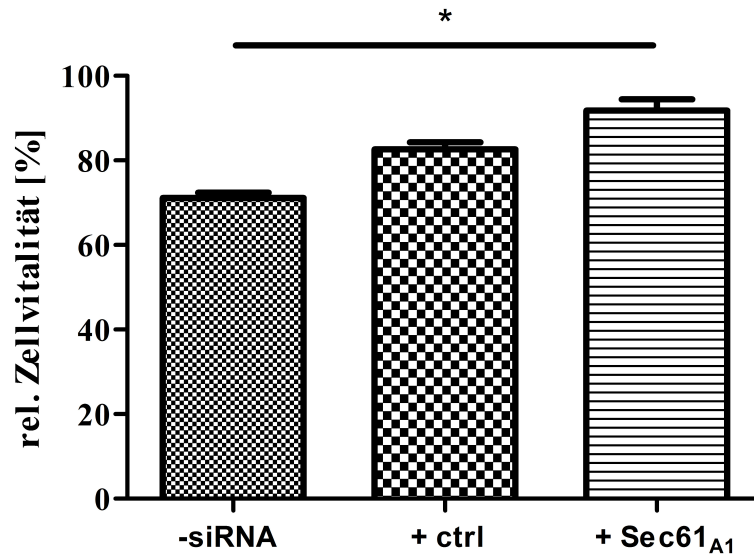


Abbildung 31: Effekt des Sec61 α -Knockdowns auf die *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{HDEL} in HeLa-Zellen. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit ctrl- bzw. Sec61_{A1}-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Die Zugabe von RTA_{His}^{HDEL} (160 μ g/ml) erfolgte nach 96 h. Nach weiteren 24 h wurden die Zellvitalitäten mittels WST-1-Vitalitätstests bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen und Signifikanz (* = $p \leq 0,05$) dargestellt. Die Zellvitalitäten wurden in Relation zu den mit Negativkontrolle-behandelten Zellen gesetzt.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die Behandlung von HeLa-Zellen mit Sec61_{A1}-siRNA zu einer signifikanten Verringerung der *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA_{His}^{HDEL} führt. Bei ctrl-siRNA transfizierten Zellen ist hingegen ein ähnlich toxischer Effekt beider Toxinvarianten wie bei untransfizierten Zellen zu beobachten. Aufgrund der fehlenden Toxizität bei rekombinantem RTA_{His} konnten die Auswirkungen eines Sec61 α -Knockdowns nicht näher analysiert werden.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl von siRNA behandelten Zellen

Um einen zusätzlichen Anhaltspunkt zu bekommen, ob ein Verlust von Sec61 α zu einer Verringerung der *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} führt, wurde die Zellzahl der unterschiedlich transfizierten Ansätze miteinander verglichen. Hierzu wurden die Zellen nach der Zellvitalitätsbestimmung geerntet und die Zellzahl im automatisierten Zellzähler Countless[®] Automated Cell Counter von Invitrogen bestimmt. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, führt die Zugabe von RTA_{His}^{KDEL} bzw. RTA_{His}^{HDEL} zu einer starken Abnahme der Zellzahl auf 47% bis 56 % in ctrl-siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Auch bei den untransfizierten Ansätzen war eine ähnliche Verringerung der Zellzahl nach Behandlung mit RTA_{His}^{KDEL} (57 %) und RTA_{His}^{HDEL} (61 %) zu sehen (Daten nicht gezeigt). Sowohl in untransfizierten

(Daten nicht gezeigt) als auch ctrl-siRNA transfizierten Zellen (103 %) war hingegen keine Veränderung der Zellzahl verglichen zur Negativkontrolle nach Inkubation mit RTA_{His} zu erkennen, was sich mit den Vitalitätsresultaten deckt und auf eine fehlende toxische Wirkung hindeutet. Im Vergleich zu den Zellvitalitäten unterscheiden sich die Zellzahlen von ctrl-siRNA transfizierten Zellen nach Behandlung mit RTA_{His}^{HDEL} bzw. RTA_{His}^{KDEL} nicht signifikant und stimmen mit den relativen Zellzahlen von untransfizierten Zellen weitestgehend überein (Daten nicht gezeigt).

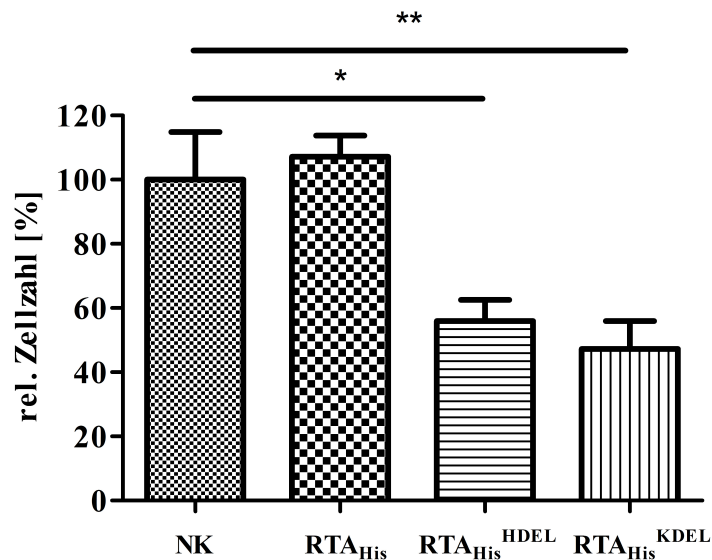


Abbildung 32: Bestimmung der Zellzahl von mit ctrl-siRNA transfizierten HeLa-Zellen. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit ctrl-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Die Zugabe der entsprechenden RTA-Varianten bzw. Negativkontrolle (160 μ g/ml) erfolgte nach 96 h. Nach 120 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels Zellzähler bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen und Signifikanz (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$) dargestellt.

Parallel dazu durchgeführte Zellzahlbestimmungen von Sec61_{A1}-UTR transfizierten HeLa-Zellen deuten abermals darauf hin, dass Sec61 α bei der Toxizität der mit zusätzlichem ER-Retentionssignal modifizierten RTA-Varianten eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 33). Im Vergleich zu untransfizierten und mit ctrl-siRNA transfizierten Zellen zeigten mit Sec61_{A1}siRNA transfizierte Zellen eine deutlich geringere Abnahme der Zellzahl nach Toxinbehandlung. Auch die statistische Auswertung konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen mit Toxin behandelten und mit Negativkontrolle behandelten Zellen feststellen. Die Abnahme der Zellzahl von RTA_{His} behandelten Zellen um ca. 10 % ist vermutlich auf den toxischen Effekt des Sec61 α -„Silencings“ zurückzuführen (Abbildung 31). Insgesamt decken sich die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung in etwa mit den Resultaten der Zellvitalitätsmessung und unterstützen somit die Vermutung, dass Sec61 α an der Retrotranslokation von RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} beteiligt ist.

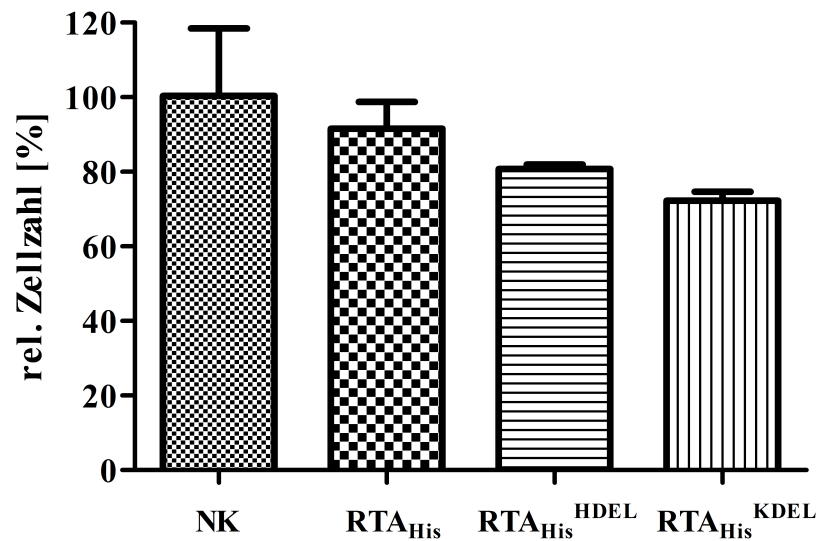


Abbildung 33: Bestimmung der Zellzahl von Sec61_{A1}-UTR-siRNA transfizierten HeLa-Zellen. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit Sec61_{A1}-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit der jeweiligen siRNA nachtransfiziert. Die Zugabe der entsprechenden RTA-Varianten bzw. Negativkontrolle (160 µg/ml) erfolgte nach 96 h. Nach 120 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels Zellzähler bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen ($n = 3$) durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen dargestellt.

3.4.3 Biochemischer Nachweis des Sec61 α -Knockdown

Neben der Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl wurde zusätzlich überprüft, ob eine effiziente Proteinreduzierung von Sec61 α mittels siRNA-Behandlung erzielt wurde. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass für die beobachtete Abnahme der *in vivo* Toxizität von RTA_{His}^{HDEL} bzw. RTA_{His}^{KDEL} der verringerte Sec61 α -Proteingehalt verantwortlich war. Dazu wurden die Zellen nach der Zellzahlbestimmung lysiert und die Zellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion von Sec61 α sowie β -Aktin mit Hilfe spezifischer Antikörper durch Western-Analyse (Punkt 2.3.1 und 2.16).

Abbildung 34 zeigt beispielhaft die Bestimmung des Restproteingehalts von Sec61 α eines Knockdown-Experiments. Dabei waren deutliche Sec61 α -Banden bei untransfizierten (-siRNA) und mit ctrl-siRNA transfizierten Zellen (+ctrl) zu erkennen, die auf Höhe der Positivkontrolle (RM) liefen. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um gereinigte raue Mikrosomen, bei denen Sec61 α sehr effizient nachweisbar ist. Die Transfektion mit Sec61_{A1}-UTR-siRNA (+Sec61_{A1}) führte hingegen zu einer starken Reduzierung der Bandenstärke. Im Western-Blot waren in allen vier Spuren nur sehr schwache Signale zu sehen.

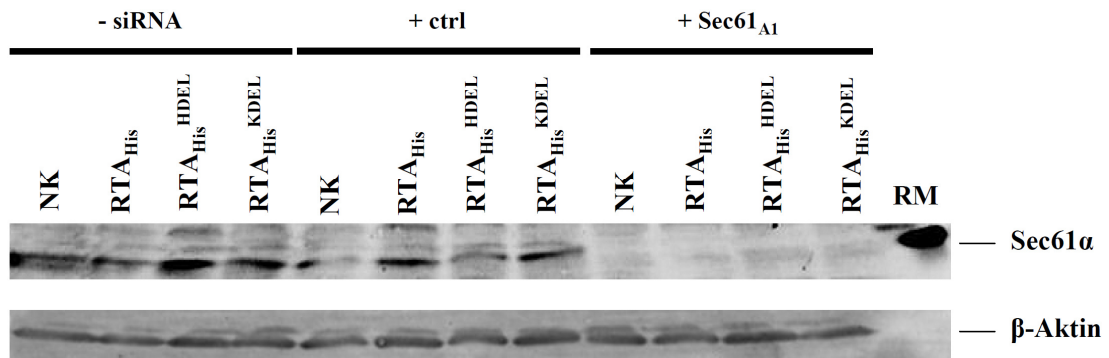


Abbildung 34: Knockdown von Sec61 α in HeLa-Zellen und Nachweis der Proteinreduzierung durch Western-Analyse. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit ctrl- und Sec61_{A1}-UTR siRNA transfiziert und nach 24 h erneut nachtransfiziert. Zusätzlich wurden untransfizierte Zellen mitgeführt (-siRNA). 96 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit den dargestellten RTA-Varianten bzw. Negativkontrolle (NK) behandelt und weitere 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und abschließend im Western-Blot mit Hilfe primärer Anti-Sec61 α - und sekundärer HRP-gekoppelter Anti-rabbit-Antikörper analysiert (Tabelle 7).

Zur Bestimmung des Restproteingehalts wurden die Proteinbanden der entsprechenden Spuren (NK, RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL}) densitometrisch quantifiziert, der Proteingehalt auf β -Aktin normiert und der Mittelwert der entsprechenden Ansätze (-siRNA, +ctrl, und +Sec61_{A1}) gebildet ($n = 4$). Der relative Proteingehalt wurde abschließend in Verhältnis zu den parallel dazu mitgeführten mit ctrl-siRNA transfizierten Ansätzen gesetzt. In Abbildung 35 ist der relative Sec61 α -Proteingehalt von zwei unabhängigen Knockdown-Experimenten ($n = 8$) dargestellt. Der zelluläre Proteingehalt an Sec61 α wurde durch den Einsatz der Sec61_{A1}-siRNA signifikant reduziert. Nach 120 h betrug der Proteingehalt durchschnittlich ca. 14 %, wohingegen zwischen unbehandelten (125 %) und ctrl-siRNA behandelten Zellen (100 %) aufgrund der hohen Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren.

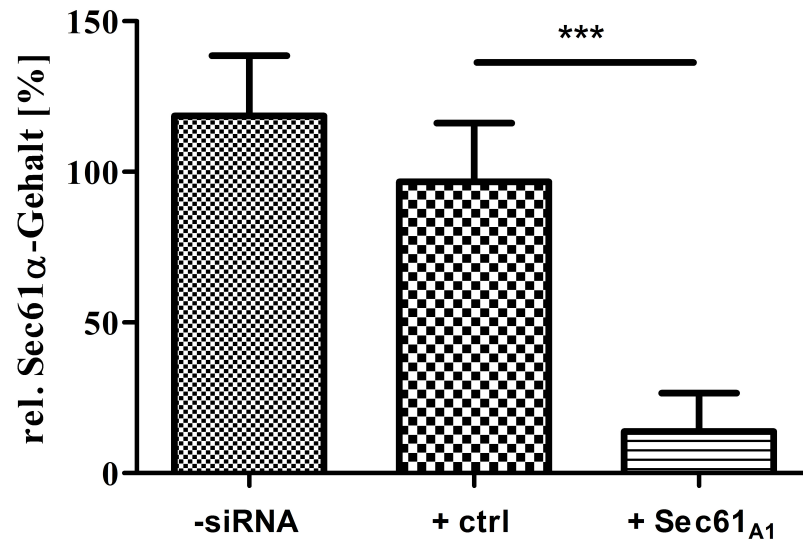


Abbildung 35: Relativer Sec61 α -Restproteingehalt unbehandelter bzw. mit siRNA behandelter HeLa-Zellen. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden mit ctrl- und Sec61_{A1}-siRNA transfiziert und nach 24 h erneut nachtransfiziert. Zusätzlich wurden untransfizierte Zellen mitgeführt (-siRNA). Nach 120 h wurden die Zellen geerntet, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und abschließend im Western-Blot mit Hilfe primärer Anti-Sec61 α - und sekundärer HRP-gekoppelter Anti-rabbit-Antikörper analysiert (Tabelle 7). Zur quantitativen Bestimmung des Restproteingehalts wurden die Proteinbanden aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 8$) auf die jeweilige Ladekontrolle (β -Aktin) normiert und der erhaltene Mittelwerte in Verhältnis zu den mit ctrl-siRNA behandelten Ansätzen gesetzt.

Zusammenfassend konnte durch den Einsatz der Sec61_{A1}-siRNA eine effiziente Reduzierung des Sec61 α -Proteingehalts erzielt werden. Zusammen mit den Resultaten der Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmungen konnte somit gezeigt werden, dass eine Verringerung von Sec61 α in HeLa-Zellen einen protektiven Effekt gegenüber RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} vermittelt. Sowohl Zellzahl als auch Zellvitalität waren nach Toxinzugabe signifikant erhöht. Die Abnahme der *in vivo* Toxizität unterstützt somit die Theorie, dass Sec61 α eine wichtige Rolle bei der Retrotranslokation beider RTA-Varianten spielt. Zukünftig muss geklärt werden, ob die Beobachtungen auf einer direkten oder indirekten Beteiligung von Sec61 α beruhen.

3.5 Untersuchungen zur *in vivo* Toxizität von RTA in Hefen

Nachdem die *in vivo* Toxizität der unterschiedlichen RTA-Varianten in Säugerzellen (Punkt 3.1.2) verifiziert wurde, sollte deren toxische Wirkung auf Hefe genauer untersucht werden. In Hefen existiert bereits ein Modell, bei dem nach intrazellulärer Expression von RTA dessen ER-Zytosol-Retrotranslokation charakterisiert werden kann (Li *et al.*, 2011a). Obwohl die Hefe ein vielversprechendes Modellsystem für die Untersuchung von RTA darstellt, fehlt ein geeignetes Testsystem zur Analyse der Toxinaufnahme und des retrograden Toxintransport vom Endosom über den Golgi-Apparat zum ER. Aus diesem Grund lag der Fokus der nachfolgenden Experimente in der Entwicklung eines hefebasierten Testsystems, um die *in vivo* Aufnahme und den retrograden Transport von RTA in Hefen beschreiben zu können. Der enorme Vorteil gegenüber säugerbasierten Testsystemen stellt dabei die große Verfügbarkeit von verschiedenen Hefe-Deletionsmutanten dar. So könnten durch ein umfassendes genetisches Screening Proteine identifiziert werden, die direkt oder indirekt am intrazellulären Transport von RTA in Hefen beteiligt sind. In weiterführenden Untersuchungen am Säuger könnte deren Einfluss auf den Transport von Ricin näher untersucht werden.

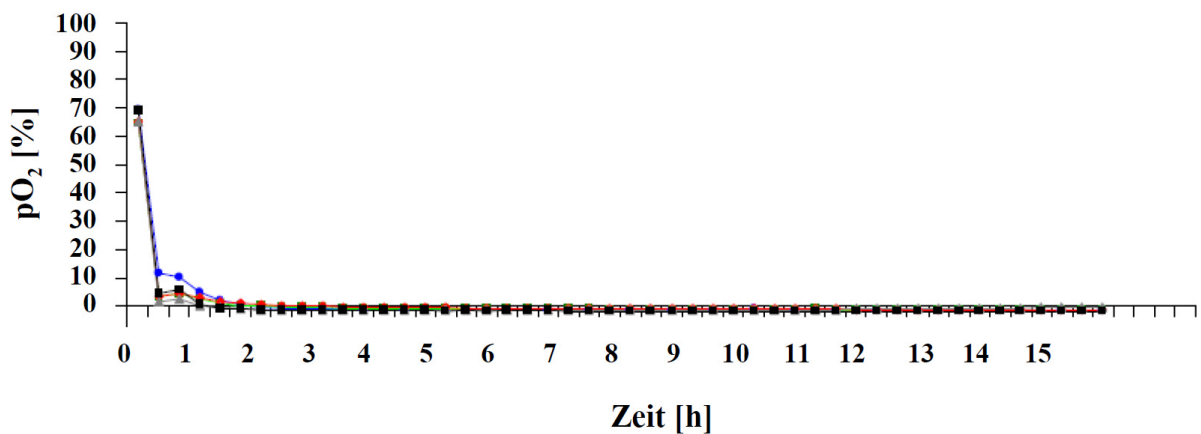
3.5.1 Respirationstest zum Nachweis der *in vivo* Toxizität in Hefen

Normalerweise wird extrazellulär appliziertes Ricin bzw. RTA nicht durch Hefezellen aufgenommen, da die für die Bindung notwendigen Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche fehlen (Lord *et al.*, 1994). Um dennoch eine Internalisierung des Toxins zu erreichen, wurde die Sensitivität von Hefesphäroplasten näher analysiert. Durch das Fehlen der Hefezellwand sollte die Aufnahme der in Punkt 3.1 hergestellten wildtypischen RTA-Varianten gewährleistet werden. Die Bestimmung der *in vivo* Toxizität wurde indirekt mit Hilfe eines Respirationstests durchgeführt (Punkt 2.14.3). Die Methode beruht auf der Messung der gelösten Sauerstoffkonzentration im Medium und deren Veränderung über die Zeit. Dies lässt direkte Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen und somit auf ihre Vitalität zu.

Zunächst wurden sowohl intakte wildtypische Hefezellen als auch Hefesphäroplasten (*S. cerevisiae* BY4742) mit den unterschiedlichen Toxinvarianten (RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL}) behandelt und die jeweilige Sauerstoffkonzentration über einen Zeitraum von 16 h analysiert. Bei intakten Zellen war in allen Ansätzen eine schnelle Abnahme der Sauerstoffkonzentration zu beobachten (Abbildung 36A). Im Gegensatz dazu war bei Hefesphäroplasten nach der Behandlung mit den entsprechenden RTA-Varianten keine

Veränderung der Sauerstoffkonzentration über den Messzeitraum zu erkennen. Die mit Negativkontrolle behandelten Ansätze (gereinigtes Eluat von BL21[pET24a⁺]) zeigten eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration. Dabei war die Abnahme vergleichbar mit der von unbehandelten Hefesphäroplasten. Außerdem zeigten Hefesphäroplasten verglichen zu intakten Hefen eine langsamere Sauerstoffaufnahme, was zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrationskurve im Diagramm führte (Abbildung 36B). Interessanterweise waren bei hohen Toxindosen (40 µg/ml bis 160 µg/ml) keine Unterschiede zwischen den Behandlungen mit RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL} zu erkennen. Alle Ansätze zeigten einen vergleichbar konstanten und hohen Level an gelöstem Sauerstoff über den Messzeitraum.

A)



B)

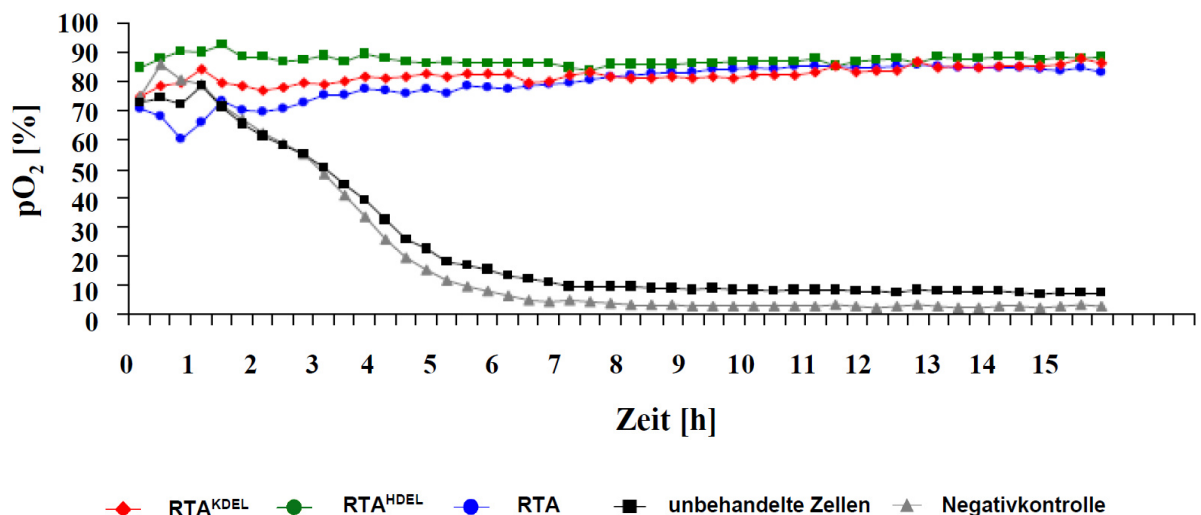


Abbildung 36: In vivo Toxizität unterschiedlicher RTA-Varianten gegenüber wildtypischen Hefesphäroplasten bzw. intakten Hefezellen *S. cerevisiae* BY4742). Die gelösten Sauerstoffkonzentrationen wurden über 16 h in der Anwesenheit von 160 µg/ml der entsprechenden RTA-Varianten bei 30°C und 120 rpm bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen. (A) Intakte Hefezellen (B) Hefesphäroplasten.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die unterschiedlichen RTA-Varianten von Hefesphäroplasten aufgenommen werden und letztendlich im Zytosol die Ribosomen inaktivieren. Im Gegensatz dazu verhindert die Zellwand der intakten Hefezellen die Toxinaufnahme und führt zur Resistenz gegenüber den extrazellulär applizierten RTA-Varianten. Zusätzlich zeigen die Resultate, dass die RTA-Variante ohne ER-Retentionssignal auch eine biologische Aktivität gegenüber Hefesphäroplasten besitzt, was in den Toxizitätsuntersuchungen an Säugerzellen nicht gezeigt werden konnte (Punkt 3.1.2).

Des Weiteren wurden Hefesphäroplasten mit Hitze-inaktivierten Toxinvarianten inkubiert und die Abnahme der Sauerstoffkonzentration über die Zeit bestimmt. Aufgrund der fehlenden biologischen Aktivität unterschieden sich die Verläufe der Sauerstoffkonzentrationen nicht von denen unbehandelter bzw. Negativkontroll-behandelter Ansätze (Abbildung 37).

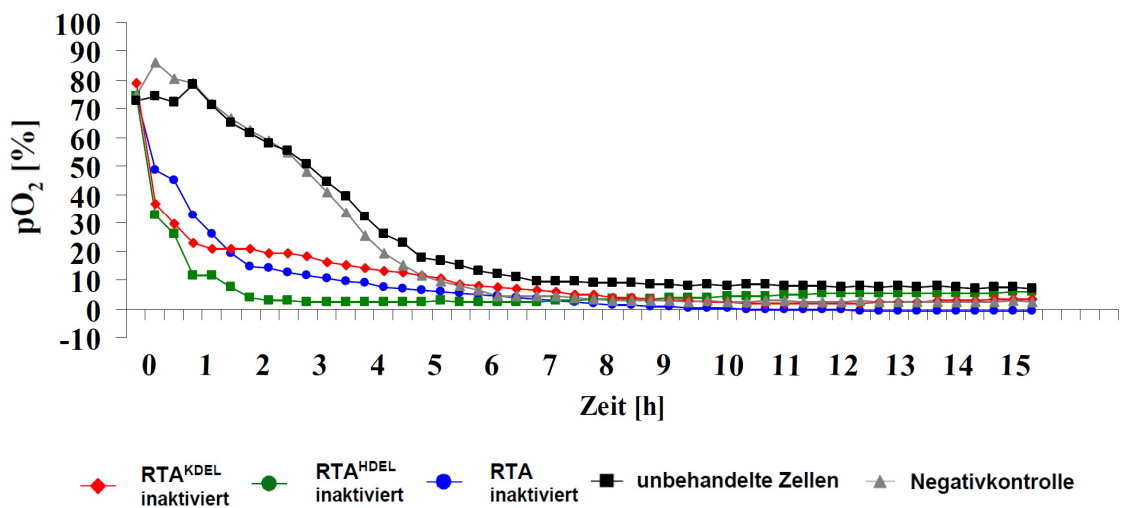


Abbildung 37: In vivo Toxizität Hitze-inaktivierter RTA-Varianten gegenüber wildtypischen Hefesphäroplasten *S. cerevisiae* BY4742). Die gelösten Sauerstoffkonzentrationen wurden über 16 h in der Anwesenheit von 160 µg/ml der entsprechenden inaktivierten RTA-Varianten bei 30°C und 120 rpm bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen.

Bei hohen Toxindosen (160 µg/ml) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen RTA-Varianten bezüglich der gelösten Sauerstoffkonzentrationen beobachtet werden. Deshalb wurden die Messungen bei einer geringeren Toxindosis von 10 µg/ml wiederholt. Wie aus Abbildung 38 zu entnehmen ist, betrug die durchschnittliche Sauerstoffkonzentration bei RTA_{His}^{HDEL}-behandelten Hefesphäroplasten nach 16 h 79,8 %, wobei die Sauerstoffkonzentrationen bei RTA_{His}-(47,1 %) bzw. RTA_{His}^{KDEL}-(50,5 %) behandelten Proben signifikant niedriger waren. Beide Varianten, RTA_{His} und RTA_{His}^{HDEL} zeigten ähnliche Sauerstoffkinetiken bei niedrigen Toxinkonzentrationen von 10 µg/ml. Die errechneten p-Werte ($p \leq 0,05$ und $p \leq 0,01$) belegten zudem die Signifikanz der beobachteten Effekte im Vergleich zu RTA_{His}^{HDEL} (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend deuten die

Daten darauf hin, dass das hefespezifische ER-Retentionssignal HDEL einen effizienteren retrograden Transport von RTA gewährleistet als dies beim säugerspezifischen ER-Retentionssignal KDEL der Fall ist. Im Vergleich zu Säugerzellen scheint das Anfügen eines KDEL-Motivs auch keine signifikante Steigerung der Toxizität in Hefesphäroplasten zu bewirken.

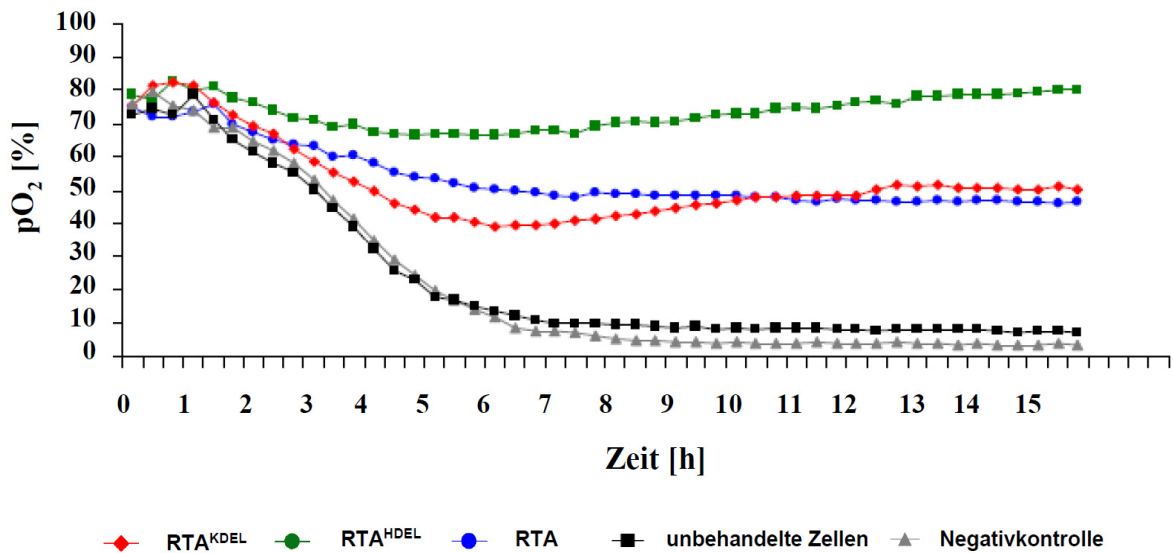


Abbildung 38: *In vivo* Toxizität unterschiedlicher RTA-Varianten gegenüber wildtypischen Hefesphäroplasten *S. cerevisiae* BY4742). Die Sauerstoffkonzentrationen wurden über 16 h in der Anwesenheit von 10 µg/ml der entsprechenden RTA-Varianten bei 30°C und 120 rpm bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen.

3.5.2 Bestätigung der *in vivo* Toxizität mittels PI-Fluoreszenz-Test

Um die Stärke und Signifikanz des hefebasierten RTA-Toxizitätstests mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde ein zusätzlicher Test verwendet. Dazu wurden Hefesphäroplasten bzw. intakte Zellen mit den entsprechenden RTA-Varianten über 24 h inkubiert, danach mit Propidium-Jodid (PI) angefärbt (Punkt 2.14.4) und abschließend die resultierenden Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Abgetötete Zellen nehmen PI auf, wodurch sich der Farbstoff in die DNA und RNA einlagert, was zur Verschiebung des Emissionsmaximums führt. Die Zunahme der PI-Fluoreszenz ist somit ein Zeichen für die toxische Wirkung der einzelnen RTA-Varianten. Nur bei Hefesphäroplasten war ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensitäten nach der Behandlung mit den unterschiedlichen RTA-Varianten (40 µg/ml) zu erkennen, wohingegen intakte Zellen keine Zunahme der Fluoreszenz zeigten (Abbildung 39). Die Resultate stimmen mit den Daten der Sauerstoffmessungen überein und untermauern somit die Leistungsfähigkeit des Testsystems.

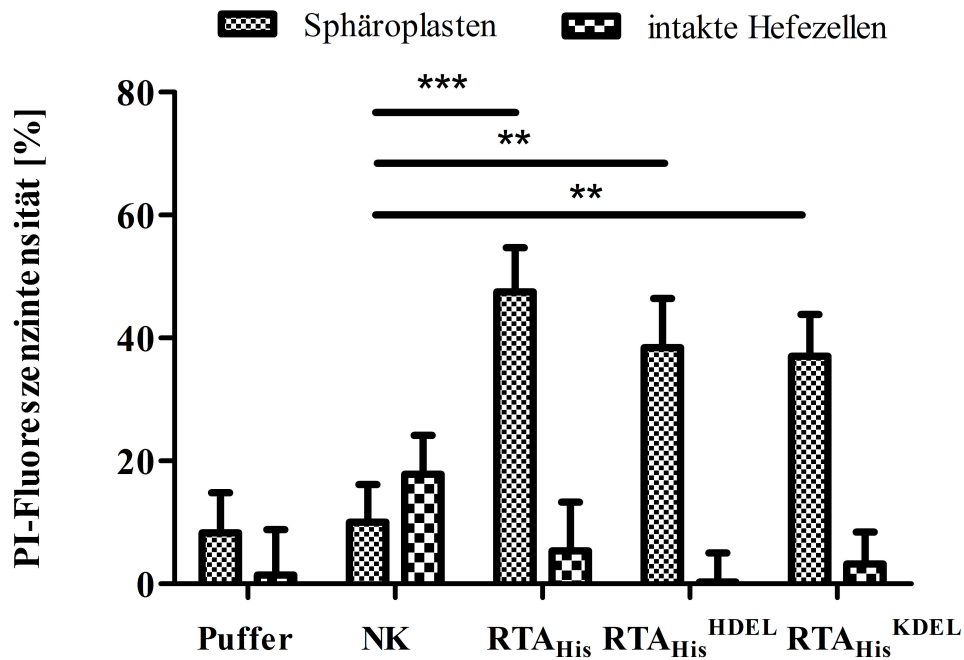


Abbildung 39: PI-Fluoreszenz von Hefesphäroplasten bzw. intakten wildtypischen Hefezellen nach Behandlung mit unterschiedlichen RTA-Varianten. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 40 µg/ml der dargestellten RTA-Varianten 24 h bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Es wurden fünffach Bestimmungen durchgeführt (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden mit denen der Positivkontrolle (100 %) verglichen. Als Positivkontrolle dienten Hitze-inaktivierte Zellen (95°C, 20 min).

3.5.3 Effekte verschiedener Deletionsmutanten auf die *in vivo* Toxizität von RTA

Da die endozytotische Aufnahme einer begrenzten Anzahl von RTA-Molekülen das Abtöten einer einzelnen Zelle *in vivo* induziert, wurde untersucht, ob eine $\Delta end3$ -Deletionsmutante einen resistenten Phänotyp gegenüber RTA aufweist (Eiklid *et al.*, 1980). Bei der $\Delta end3$ -Mutante sind frühe Schritte der „Fluid phase“-Endozytose sowie der Rezeptor-vermittelten Endozytose blockiert, wodurch die Aufnahme der einzelnen Toxinvarianten verhindert werden sollte (Raths *et al.*, 1993). $\Delta end3$ -Hefesphäroplasten wurden unter gleichen Bedingungen wie wildtypische Zellen getestet, wobei ein effektiver Schutz gegen alle drei Toxinvarianten (RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL}) zu beobachten war. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration war vergleichbar mit den Kontrollansätzen, was auf ein Überleben der Zellen hindeutet (Abbildung 40A). Der gleiche resistente Phänotyp war auch bei Hefesphäroplasten einer $\Delta rpl12B$ -Deletionsmutante zu sehen. Dieser Mutante fehlt ein Protein der großen ribosomalen 60S Untereinheit, wodurch die Zellen resistent gegenüber einer intrazellulären RTA-Expression sind (Schnöder, 2009).

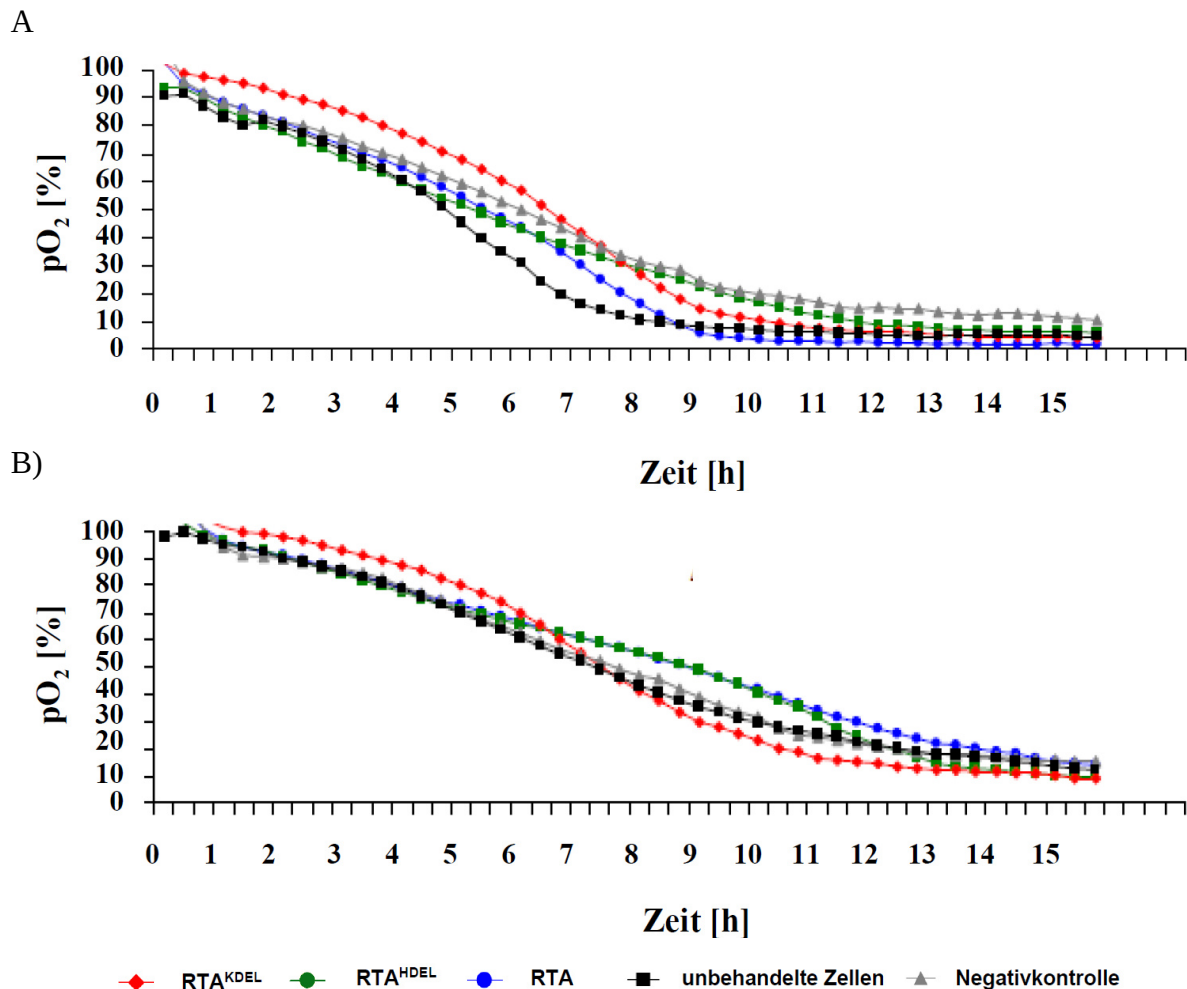


Abbildung 40: In vivo Toxizität unterschiedlicher RTA-Varianten gegenüber Hefesphäroplasten verschiedener Hefe-Deletionsmutanten *S. cerevisiae* BY4742). Die Sauerstoffkonzentrationen wurden über 16 h in der Anwesenheit von 160 µg/ml der entsprechenden RTA-Varianten (siehe Legende) bei 30°C und 120 rpm bestimmt. Es wurden dreifach Bestimmungen (n = 3) durchgeführt und deren Mittelwerte aufgetragen. **(A)** Endosomale Deletionsmutante $\Delta end3$ **(B)** Ribosomale Deletionsmutante $\Delta rpl12B$.

Die Etablierung eines innovativen und sensitiven Testsystems zur Untersuchung des retrograden Transports von RTA konnte durch die Experimente erfolgreich abgeschlossen werden. Das neue Testsystem bietet künftig die Möglichkeit, verschiedene Deletionsmutanten auf deren Beteiligung am Toxintransport zu testen. Zusätzlich bestätigten die Daten, dass rekombinant exprimiertes RTA_{His} aus *E. coli* durchaus eine biologische Aktivität besitzt. Außerdem führt das Anfügen eines hefespezifischen ER-Retentionssignals HDEL zu einer signifikanten Steigerung der Toxizität von RTA, wohingegen das KDEL-Motiv keine Zunahme der Toxizität in Hefen vermittelt. Zudem belegen die resistenten Phänotypen von $\Delta end3$ und $\Delta rpl12B$, dass alle RTA-Varianten durch Endozytose internalisiert werden und ihre toxische Wirkung auf die Inaktivierung der hefeeigenen Ribosomen zurückzuführen ist.

3.6 Untersuchungen zum retrograden Transport von RTA in Hefen

Da die externe Zugabe von RTA_{His} eine *in vivo* Toxizität in Hefesphäroplasten hervorruft, wurde neben dem Sauerstoff-basierten Testsystem (Punkt 3.5.1) ein weiteres Testsystem zur Untersuchung des retrograden Transports entwickelt. Aufbauend auf den Untersuchungen von Schnöder (2009) bestand das Anliegen darin, ein einfaches und sensitives Testsystem zu etablieren, das ein kostengünstiges und schnelles Screening verschiedener Deletionsmutanten mit Defekten im intrazellulären Transport erlaubt. Die Methode basiert auf der indirekten Bestimmung des Zellwachstums durch die *in vivo* Translation eines GFP-Reporterplasmids und der anschließenden Messung der resultierenden GFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders. In der vorliegenden Arbeit wurde das von Schnöder (2009) konstruierte Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP verwendet (Abbildung 41 und Tabelle 6). Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus dem für Hefen Kodon-optimierten yGFP und der Signalsequenz des Killertoxins K28. Das Reporterkonstrukt befindet sich unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors, wodurch dessen GFP-Expression gezielt induziert werden kann.

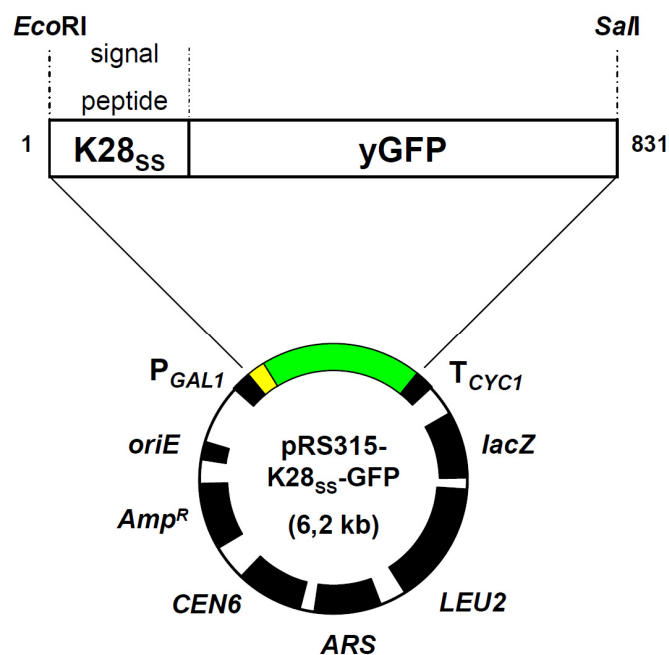


Abbildung 41: Schematische Darstellung des GFP-Reporterplasmids pRS315-K28_{SS}-GFP. Das Fusionsgen steht unter der transkriptionellen Kontrolle des *GAL1*-Promotors und *CYC1*-Terminators, was eine induzierbare GFP-Expression erlaubt. Die Anzahl der Aminosäuren sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Zu Beginn des Versuchs wurden die zu testenden wildtypischen Hefen bzw. Hefe-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* BY4742 mit dem Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP transformiert. Nach Kultivierung und Entfernung der Zellwand durch Zymolyase-Behandlung wurde die Expression des GFP-Reporterplasmids in den jeweiligen Hefesphäroplasten induziert und zeitgleich RTA_{His} bzw. Negativkontrolle von außen zugegeben. Die Detektion der GFP-Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzreader analysiert und die relativen Fluoreszenzwerte der einzelnen Deletionsmutanten mit den wildtypischen Werten verglichen. Die Inaktivierung der Ribosomen und die damit verbundene Hemmung der Proteinbiosynthese durch RTA sollten sich in einer verminderten GFP-Fluoreszenz widerspiegeln. Deletionsmutanten mit erhöhter GFP-Fluoreszenz deuten somit darauf hin, dass die in den Mutanten fehlenden Genprodukte am intrazellulären Transport von RTA beteiligt sind. Der schematische Versuchsablauf des Mikrotiterplatten-GFP-Reportersystems ist in Abbildung 42 verdeutlicht (Punkt 2.14.5).

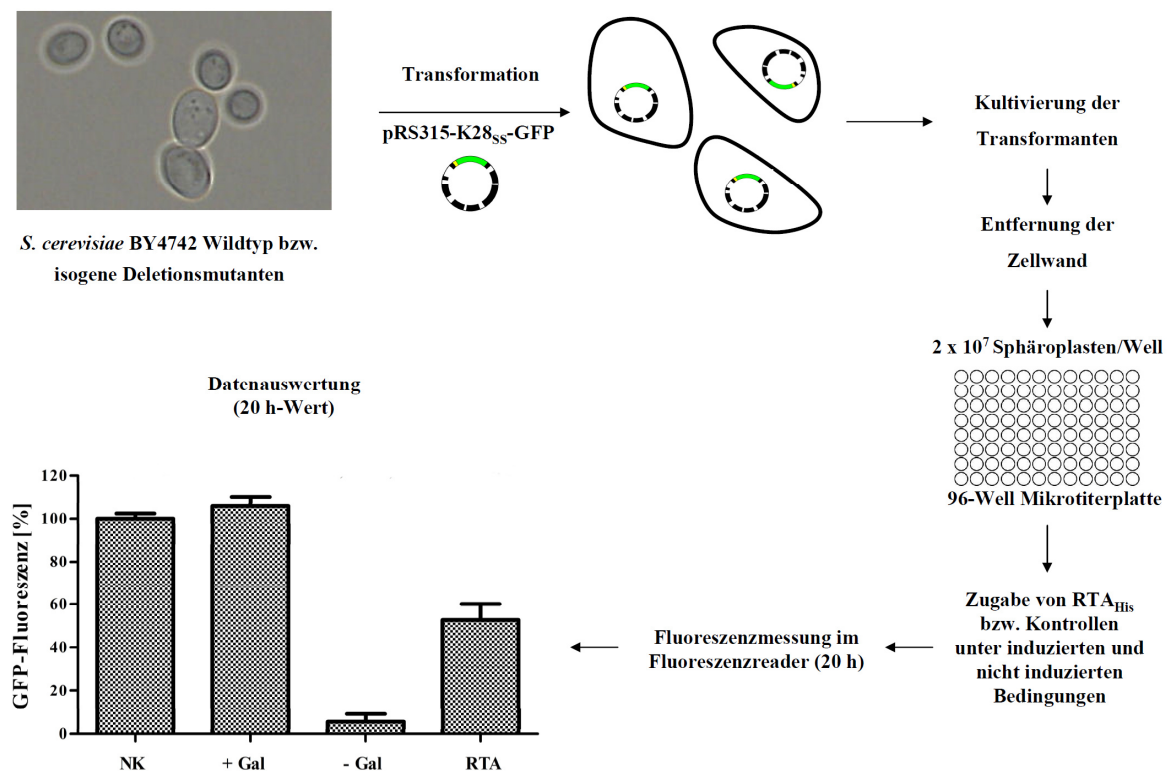


Abbildung 42: Experimentelles Setup des Mikrotiterplatten-GFP-Reportersystems. Nachdem die entsprechenden Hefestämme mit dem Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP transformiert wurden, erfolgte die Kultivierung bis zur exponentiellen Phase. Danach wurde die Zellwand entfernt und 2 x 10⁷ Hefesphäroplasten in 96 Well Mikrotiterplatten ausgesät. Unter induzierenden oder nicht-induzierenden Bedingungen wurden 160 µg/ml RTA_{His} bzw. Negativkontrolle hinzugegeben und die GFP-Fluoreszenz im Fluoreszenzreader über 20 h gemessen. Abschließend wurden die Daten der getesteten Hefe-Deletionsmutanten ausgewertet und mit dem Wildtyp verglichen.

3.6.1 Validierung des GFP-Reporter-Testsystems

Um sicherzustellen, dass eine Hemmung der Proteinbiosynthese auch eine Reduzierung der GFP-Fluoreszenz induziert, wurden induzierte wildtypische Hefesphäroplasten, die das Reporterplasmid besaßen, mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) behandelt und die Entwicklung der GFP-Fluoreszenz analysiert. Dabei inhibiert das Antibiotikum den Elongationsschritt während der Translation, wodurch die Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen irreversibel blockiert wird (Bar-Nun *et al.*, 1983). Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten Geneticin-behandelte Zellen eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz nach 20 h (Abbildung 44). Die Inhibition der Proteinbiosynthese beeinflusst direkt die Bildung der GFP-Fluoreszenz. Mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Testsystems kann somit der Effekt von extern appliziertem RTA untersucht werden.

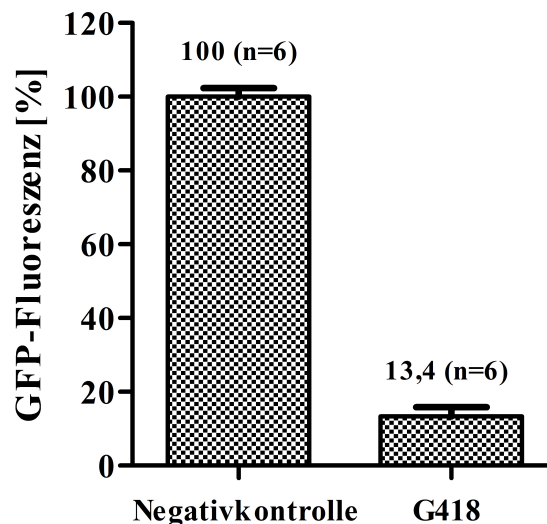


Abbildung 43: Inhibition der Proteinbiosynthese durch Geneticin induziert verringerte GFP-Fluoreszenz. *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit dem Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP transformiert und die GFP-Fluoreszenz der Zellen mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Tests in Anwesenheit bzw. Abwesenheit (Negativkontrolle) von 300 µg/ml Geneticin (G418) bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern sind zusätzlich die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die ermittelten Fluoreszenzwerte der Negativkontrolle wurden auf 100 % gesetzt.

Daher wurde im nächsten Schritt die Fluoreszenz von wildtypischen Hefesphäroplasten in der Anwesenheit von RTA_{His} bzw. Negativkontrolle bestimmt und die Resultate mit induzierten und nicht-induzierten Zellen verglichen. Durch den Einsatz der Negativkontrolle sollte eine mögliche negative Auswirkung auf die Expression von GFP ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 44 zu sehen, war kaum eine Fluoreszenz (5,5 %) in nicht-induzierten Proben detektierbar. Induzierte Zellen (105,9 %) zeigten eine ähnlich starke Fluoreszenz wie

Negativkontroll-behandelte Zellen (100 %), wohingegen die Behandlung mit RTA_{His} zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenz auf 52,8 % führte. Die Resultate belegen, dass der toxische Effekt von RTA mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit entwickelten GFP-Fluoreszenz-Testsystems indirekt bestimmt werden kann.

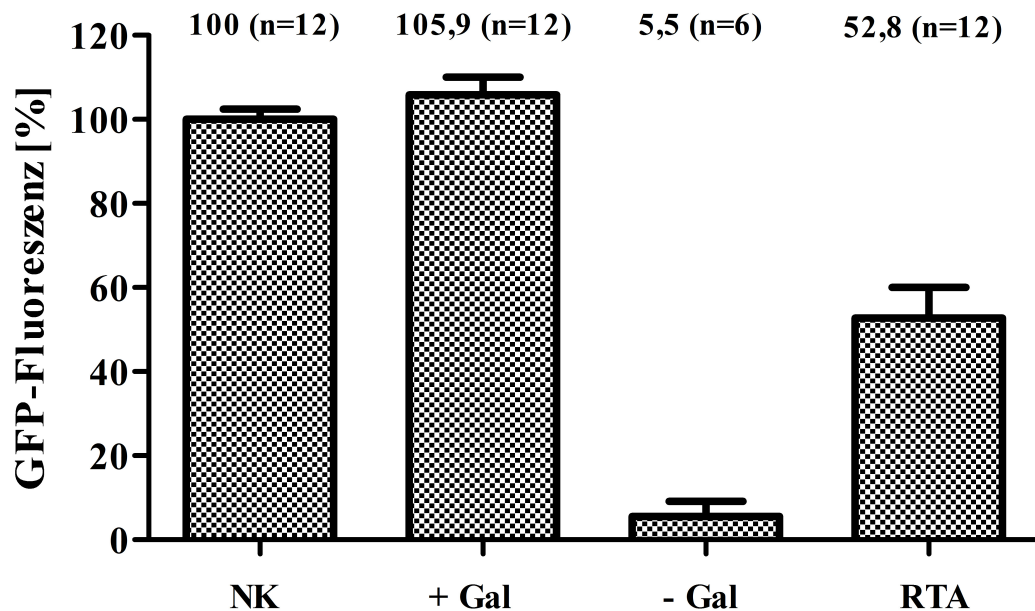


Abbildung 44: Behandlung mit RTA induziert eine Abnahme der GFP-Fluoreszenz. *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit dem Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP transformiert und die GFP-Fluoreszenz der Zellen mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Tests unter induzierenden (+Gal) und nicht-induzierenden (-Gal) Bedingungen bestimmt. Zusätzlich wurden induzierte Hefesphäroplasten in Anwesenheit von RTA (160 µg/ml) bzw. Negativkontrolle (NK) inkubiert. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist zusätzlich die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die ermittelten Fluoreszenzwerte der Negativkontrolle wurden auf 100 % gesetzt.

Im zweiten Schritt der Validierung des GFP-Fluoreszenz-Testsystems wurde der Einfluss von extern appliziertem RTA auf die GFP-Expression bei den Hefe-Deletionsmutanten *Δder1*, *Δhrd1*, *Δyos9* und *Δnup120* untersucht. Der1p als auch Hrd1p sind an der Retrotranslokation von intrazellulär exprimierten RTA in Hefen beteiligt und sollten daher eine verminderte Fluoreszenz im Testsystem zeigen (Li *et al.*, 2011a). Im Gegensatz dazu hat die Deletion von YOS9 keinen Einfluss auf den Toxintransport in Hefen (Li *et al.*, 2011a). Die Deletionsmutante *Δnup120* weist einen Defekt in einem nicht-essentiellen Kernporen-Protein auf und sollte somit nicht am Wirkmechanismus von RTA beteiligt sein (Aitchison *et al.*, 1995). Beide Mutanten dienten als Negativkontrolle und es sollte keine Veränderung der Fluoreszenz verglichen zum Wildtyp sichtbar sein. Bei *Δder1* und *Δhrd1* war eine Zunahme der Fluoreszenz auf 82,1 % und 85,7 % zu beobachten, wohingegen bei *Δyos9* (55,7 %) und

Δnup120 (52,0 %) kein signifikanter Unterschied zu wildtypischen Zellen erkennbar war (Abbildung 45). Die Resultate entsprechen somit exakt den Erwartungen.

Um nur solche Hefe-Deletionsmutanten zu identifizieren, die einen starken Einfluss auf den intrazellulären Transport von RTA haben, wurde abschließend ein Signifikanz-Schwellenwert definiert. Da die erhaltenen Fluoreszenzwerte der beiden Positivkontrollen *Δder1* und *Δhrd1* zwischen 80 % und 85 % lagen, wurde der Schwellenwert auf 75 % festgelegt. Dieser Wert liegt rund 25 % über dem durchschnittlichen Wert von toxinbehandelten, wildtypischen Zellen, wodurch falsch positive Ergebnisse verhindert werden sollten.

Insgesamt konnte die Leistungsfähigkeit des GFP-Fluoreszenz-Testsystems durch die Versuche untermauert werden. Die RTA-bedingte Hemmung der Proteinbiosynthese kann indirekt anhand der GFP-Fluoreszenz verfolgt werden. Damit steht eine weitere Methode zur Verfügung, um potentielle, am retrograden Transport von RTA beteiligte Proteine in Hefen zu identifizieren.

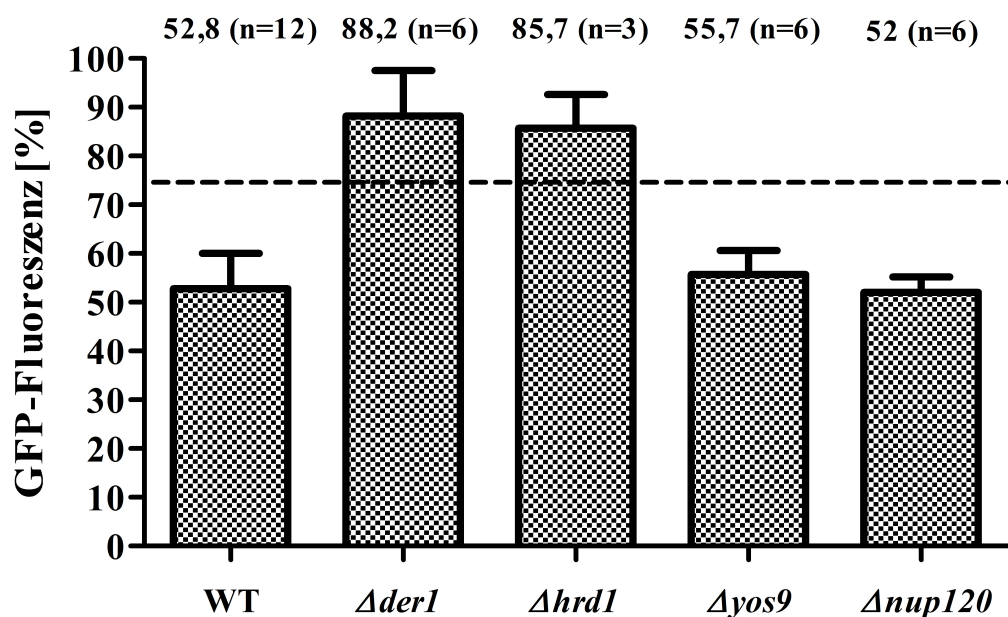


Abbildung 45: Validierung des GFP-Fluoreszenz-Testsystems. Hefesphäroplasten der unterschiedlichen Deletionsmutanten *Δder1*, *Δhrd1*, *Δyos9* und *Δnup120* wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 µg/ml RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz der Zellen bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist zusätzlich die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

3.6.2 Screening von Mutanten mit Defekten im retrograden Transport

Nach der Etablierung und Validierung des Testsystems wurden unterschiedliche Hefe-Deletionsmutanten untersucht, die am retrograden Transport in Hefen beteiligt sind. Zunächst wurde der Transport von den Endosomen zum TGN näher charakterisiert. Der Ypt6p-vermittelte Transport spielt dabei eine entscheidende Rolle und wurde genauer begutachtet (Bonifacino und Rojas, 2006; Li und Warner, 1996; Luo und Gallwitz, 2003). Ypt6 stellt eine wichtige GTPase dar, die vorwiegend die Fusion von endosomalen Vesikeln mit dem TGN reguliert. Zusätzlich unterliegt die GTPase einer strengen Regulation durch Rgp1p und Ric1p. Beide Proteine bilden *in vivo* einen Komplex und fungieren als Nukleotidaustauschfaktor für Ypt6p (Siniosoglou *et al.*, 2000). Es ist zudem bekannt, dass der siRNA-vermittelte Knockdown des Säuger-Homologs von Ypt6p, Rab6a, zu einem reduzierten toxischen Effekt von Ricin auf HeLa-Zellen führt (Moreau *et al.*, 2011; Utskarpen *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde analysiert, inwieweit sich der Verlust von einzelnen Komponenten des GARP-Komplexes sowie von Tlg2p auf den Transport von RTA auswirkt. In Hefen setzt sich der GARP-Komplex aus den Proteinen Vps51p, Vps52p, Vps53p und Vps54p zusammen. Der Komplex vermittelt dabei das Andocken von Transportvesikeln am TGN (Moreau *et al.*, 2011; Perez-Victoria und Bonifacino, 2009). Der GARP-Komplex ist ebenfalls in der Lage, mit Syntaxin 16 (Stx16), dem Säuger-Homolog von Tlg2p, zu interagieren (Perez-Victoria und Bonifacino, 2009). Sowohl Stx16 als auch einzelne Komponenten des GARP-Komplexes sind für den intrazellulären Ricin-Transport von essentieller Bedeutung (Moreau *et al.*, 2011).

Verglichen zu wildtypischen Zellen zeigten $\Delta ypt6$ (104,1 %), $\Delta rgp1$ (98,1 %), $\Delta vps54$ (11,5 %) und $\Delta vps51$ (101,3 %) eine signifikante Zunahme der GFP-Fluoreszenz. Dabei erreichte die Fluoreszenz der Deletionsmutanten ähnliche Werte wie mit Negativkontrolle behandelte Zellen (100 %). Unter dem Schwellenwert von 75 % blieben nur $\Delta vps52$ (52,5 %) und $\Delta tlg2$ (66,9 %) (Abbildung 46). Die GTPase Ypt6p sowie deren Regulator Rgp1p sind demnach entscheidend am RTA-Transport in Hefen beteiligt. Interessanterweise sind nur die Komponenten Vps54p und Vps51p in den Toxintransport involviert, wohingegen Vps52p keine Rolle zu spielen scheint. Auch Tlg2p liegt unter dem definierten Schwellenwert, wobei eine leichte Fluoreszenzzunahme von ca. 16 % zu verzeichnen war.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Membranproteins Sft2p näher untersucht. Dieses Hefeprotein hat Ähnlichkeiten zum Syntaxin 5 des Säugers und ist wahrscheinlich in Hefen in den retrograden Transport zum Golgi-Apparat involviert (Conchon *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Syntaxin 5 wichtig für den Transport von Ricin im Säuger ist.

Die Behandlung mit Retro-2 schützt Mäuse vor einer letalen Dosis von Ricin. Dabei inhibiert Retro-2 selektiv die Fusion von Syntaxin 5-positiven Vesikeln mit dem TGN in Säugerzellen (Stechmann *et al.*, 2010). Die GFP-Fluoreszenz von $\Delta sft2$ stieg signifikant auf 84,1 % (Abbildung 46). Ähnlich wie bei Säugerzellen, beeinflusst der Verlust von Sft2p auch den retrograden Transport von RTA in Hefen.

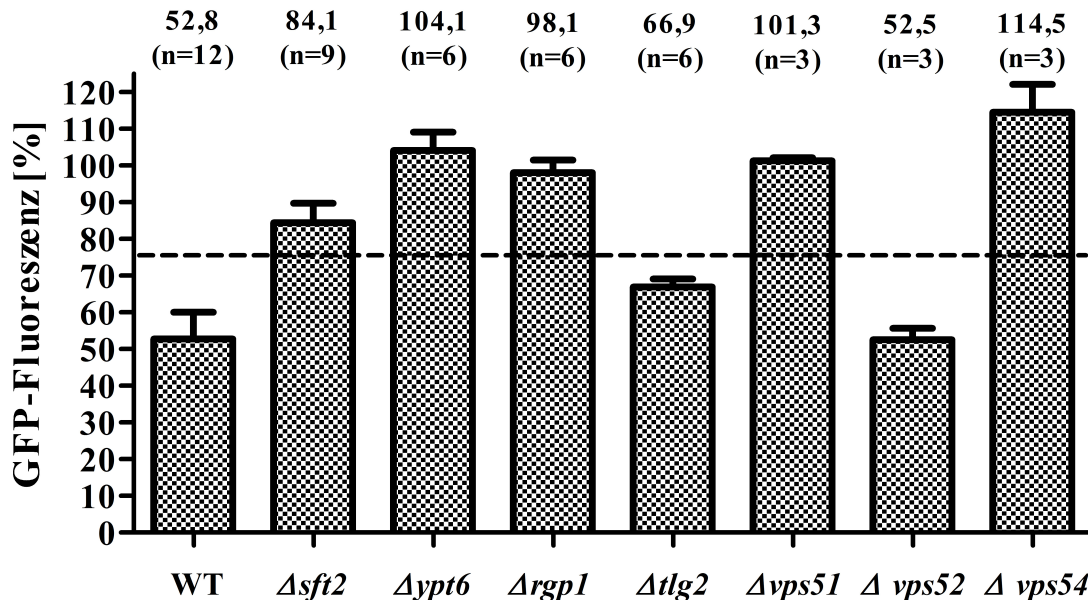


Abbildung 46: Rolle von Sft2p, Tlg2p, Ypt6p, Rgp1p sowie von Komponenten des GARP-Komplexes beim retrograden Transport von RTA in Hefen. Hefesphäroplasten der dargestellten Deletionsmutanten wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 µg/ml RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

Als nächstes wurde ein weiterer wichtiger Proteinkomplex, das Retromer, genauer analysiert. Die Aufgabe dieses Komplexes besteht in der Formation von Transportvesikeln an den Endosomen, die für den Transport zum Golgi-Apparat bestimmt sind (Johannes und Popoff, 2008). In Hefen beinhaltet der Komplex die Proteine Vps5p, Vps17p, Vps35p, Pep8p/Vps26p und Vps29p (Seaman *et al.*, 1998). Moreau *et al.* (2011) konnten in siRNA-Knockdown Experimenten keine Beteiligung des Retromers feststellen. Säugerzellen zeigten eine unveränderte Sensitivität gegenüber Ricin. Um die Situation in Hefen zu klären, wurden die Hefe-Deletionsmutanten aller Retromer-Komponenten mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Testsystems untersucht. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Bei $\Delta pep8$, $\Delta vps5$, $\Delta vps17$, $\Delta vps29$ und $\Delta vps35$ waren keine signifikanten Zunahmen in der Fluoreszenz nach Toxinbehandlung zu beobachten und entsprachen in etwa den wildtypischen Fluoreszenzwerten. Zusätzlich wurde noch der Einfluss von Snx4p und Snx41p untersucht.

Dabei handelt es sich um zwei Sorting-Nexine, die zusammen mit dem Retromer für den Rücktransport von Proteinen, wie z. B. Snc1p, vom Endosom zum TGN verantwortlich sind (Hettema *et al.*, 2003). $\Delta snx41$ (52,8 %) zeigte ähnliche Fluoreszenzwerte wie wildtypische Zellen, wohingegen die Fluoreszenz von $\Delta snx4$ (37,1 %) unter der des Wildtyps lag (Abbildung 47). Anhand der Fluoreszenzdaten spielen Retromer sowie das Sorting-Nexin Snx41p keine Rolle beim retrograden Transport von RTA in Hefen.

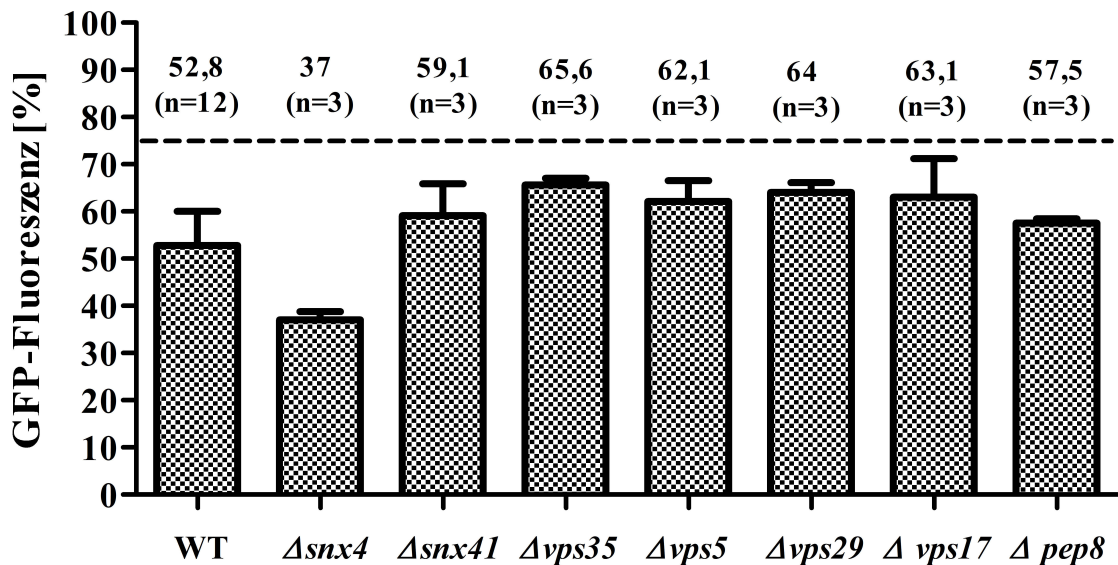


Abbildung 47: Beteiligung des Retromers sowie der Sorting-Nexine Snx4p und Snx41p am Endosom-Golgi-Transport von RTA in Hefen. Hefesphäroplasten der dargestellten Deletionsmutanten wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 µg/ml RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

Im letzten Teil der Untersuchungen zum Endosom-Golgi-Transport von RTA in Hefen wurde die Beteiligung des COPIB-vermittelten Transports vom Endosom zum TGN näher betrachtet. Hierzu wurden die zwei Hefe-Deletionsmutanten $\Delta gcs1$ und $\Delta sec28$ getestet. Gcs1p stellt einen Regulator dar und vermittelt den COPI-Vesikeltransport vom Endosom zum Golgi, wobei Sec28p eine Untereinheit des Coatomer Unterkomplexes B darstellt (Eugster *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2006). In Hefen ist Sec28p für die Stabilität dieses Komplexes verantwortlich. Die Fluoreszenzwerte von $\Delta gcs1$ (66,3 %) und $\Delta sec28$ (59,6 %) lagen deutlich unter dem definierten Schwellenwert (Abbildung 48), so dass beide Resultate auf eine fehlende Beteiligung des COPIB-vermittelten RTA-Transports in Hefen hindeuten.

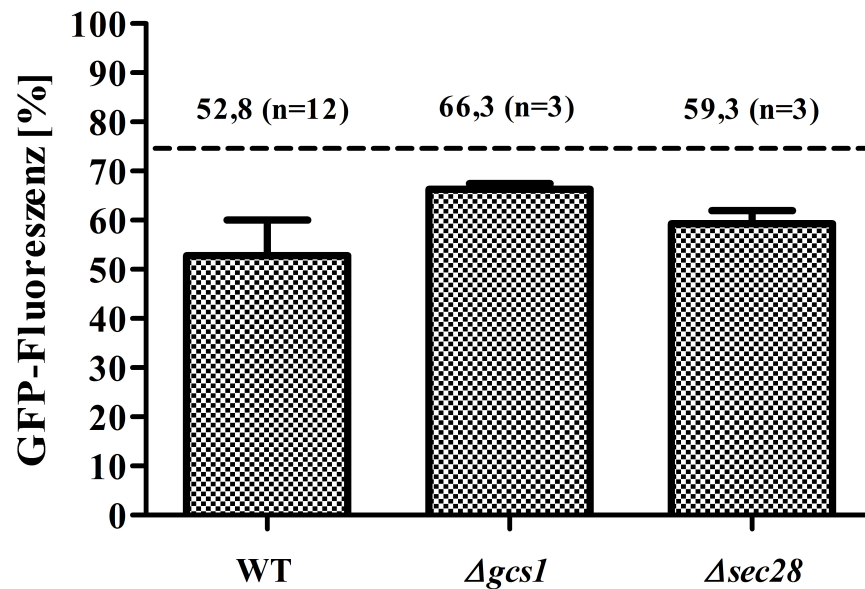


Abbildung 48: Einfluss des COPIB-vermittelten Endosom-Golgi-Transports auf den RTA-Transport in Hefen. Hefesphäroplasten der dargestellten Deletionsmutanten wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 $\mu\text{g/ml}$ RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

Neben dem retrograden Transport vom Endosom zum Golgi wurden im weiteren Verlauf unterschiedliche Deletionsmutanten mit Defekten im Golgi-ER-Transport näher analysiert. Bislang ist der Transportmechanismus im Säuger nur sehr wenig verstanden und beruht zum Großteil auf Vermutungen und Theorien. Neueste Studien deuten jedoch darauf hin, dass ERGIC2 eine entscheidende Aufgabe bei diesem Transportschritt übernimmt (Moreau *et al.*, 2011). Der Knockdown von ERGIC2 in Säugerzellen führt zu einer Resistenz gegenüber hohen Ricin-Dosen. Hefen besitzen ein ERGIC2-homologes Protein, Erv41p, welches zusammen mit Erv46p einen aktiven Komplex bildet und zwischen ER und Golgi zirkuliert (Otte und Barlowe, 2002). Bei der Deletionsmutante Erv46p war eine leichte signifikante Zunahme der Fluoreszenz (77,5 %) verglichen zum Wildtyp zu beobachten (Abbildung 49). Nachdem die vermutliche Beteiligung von Erv46p am Transport von RTA gezeigt werden konnte, wurden die beiden Regulatoren der Arf-GTPasen, Glo3p und Gea1p, untersucht. Dabei repräsentiert Glo3p ein Arf-aktivierendes Protein (ARF-GAP), welches den Golgi-ER-Transport vermittelt und die Bildung von COPI-Vesikeln reguliert, wohingegen Gea1p einen Guanin-Austauschfaktor für die Arf-GTPasen darstellt (Lewis *et al.*, 2004; Poon *et al.*, 1999; Spang *et al.*, 2001). In Hefen konnte gezeigt werden, dass der Nukleotidaustausch an den Arf-GTPasen durch Gea1p vermittelt wird und dieser Prozess essentiell für den Golgi-ER-

Transport *in vivo* ist (Peyroche *et al.*, 1996). Die Deletionen von *GEA1* (83,5 %) und *GLO3* (104,1 %) besaßen einen starken Einfluss auf den Transport von RTA. Nach Toxinbehandlung überschritten die Fluoreszenzwerte den Schwellenwert von 75 % in beiden Fällen (Abbildung 49). Die Regulation der Arf-GTPasen ist vermutlich wichtig für den effizienten Toxintransport in Hefe. Zugleich deutet dies auf die Beteiligung der Arf-GTPasen am Golgi-ER-Transport von RTA in Hefen hin.

Außerdem wurde der Einfluss der Deletionsmutanten *Δsec22* und *Δrer1* auf den RTA-Transport charakterisiert. Es ist bekannt, dass Rer1p an der Golgi-Membran lokalisiert ist und wahrscheinlich für den Rücktransport einer Reihe von ER-Membranproteinen verantwortlich ist (Sato *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu stellt Sec22p ein r-SNARE Protein dar, welches im Komplex mit Bet1p, Bos1p und Sed5p vorkommt (Liu *et al.*, 2004). Der Komplex zirkuliert zwischen Golgi- und ER-Kompartiment und ist sowohl am retrograden als auch anterograden Transport von Hefen beteiligt (Liu und Barlowe, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass das säugerspezifische Sec22p-Homolog, Sec22B, wichtig für die *in vivo* Toxizität von Ricin ist, wurde der Einfluss von *Δsec22* mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Tests in Hefen charakterisiert. Der Verlust von *SEC22* (93,2 %) als auch *RER1* (83,7 %) verursachte eine starke Fluoreszenzzunahme in Anwesenheit von RTA, was auf die Beteiligung beider Transportrouten am retrograden Transport von RTA hindeutet (Abbildung 49).

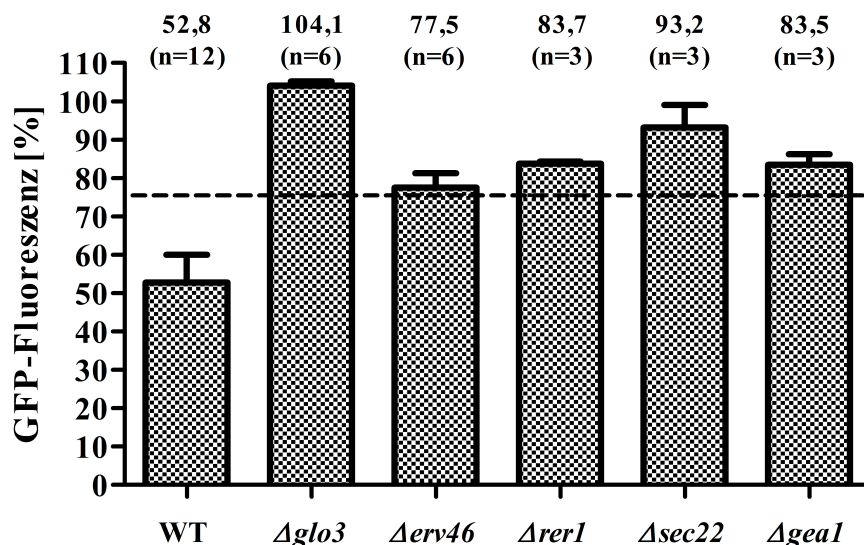


Abbildung 49: Beteiligung der Deletionsmutanten *Δerv46*, *Δglo3*, *Δgea1*, *Δsec22* und *Δrer1* am Golgi-ER-Transport von RTA in Hefen. Hefesphäroplasten der unterschiedlichen Deletionsmutanten wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 µg/ml RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

Abschließend wurde der Einfluss von drei weiteren Hefeproteinen (Syn8p, Sso1p und Snc1p) auf den Toxintransport untersucht (Aalto *et al.*, 1993; Lewis und Pelham, 2002). Vermutlich spielen alle Proteine bei der Endozytose in Hefen eine Rolle (Gurunathan *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000). Um die Beteiligung der Proteine an der Endozytose von RTA zu verifizieren, wurden die dazugehörigen Deletionsmutanten mittels GFP-Fluoreszenz-Tests analysiert. Wie in Abbildung 50 zu erkennen, bestätigt die Zunahme der Fluoreszenz verglichen zum Wildtyp, dass die Deletion von *SYN8* (82,8 %), *SSO1* (78,2 %) als auch *SNC1* (85,4 %) einen starken Effekt auf den Toxintransport in Hefen hat.

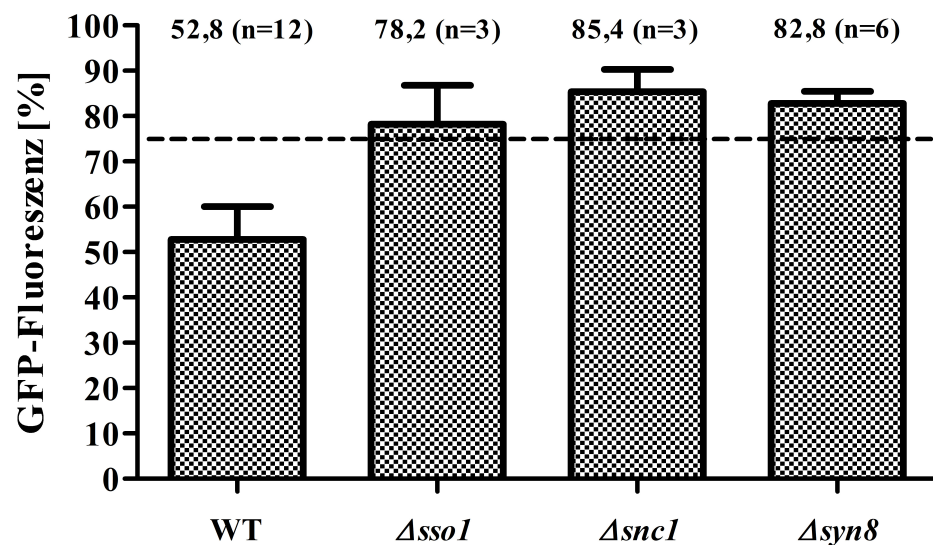


Abbildung 50: Rolle von Syn8p, Sso1p sowie Snc1p bei der Endozytose von RTA in Hefen. Hefesphäroplasten der dargestellten Deletionsmutanten wurden unter induzierenden Bedingungen 20 h in Anwesenheit von 160 $\mu\text{g/ml}$ RTA_{His} bzw. Negativkontrolle inkubiert und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Die Fluoreszenzwerte wurden in Relation zu den Werten der jeweiligen Negativkontrolle gesetzt.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit somit unterschiedliche Hefe-Deletionsmutanten identifiziert werden, die am retrograden Transport von RTA beteiligt sind. Die meisten der identifizierten Proteine besitzen Säuger-Homologe, die auch beim intrazellulären Transport von Ricin eine entscheidende Rolle spielen. Jedoch wurden darüber hinaus auch Kandidaten, wie z. B. Rer1p, entdeckt, deren Homolog im Säuger bislang noch nicht mit dem Transport von Ricin in Zusammenhang gebracht wurde. Möglicherweise können künftige Untersuchungen an Säugerzellen die Beteiligung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Kandidatenproteine am Intoxifikationsmechanismus von Ricin bestätigen.

3.6.3 Untersuchungen zur Verwendung des Testsystems für hefespezifische Toxine

Neben der Untersuchung des retrograden Transports von RTA sollte überprüft werden, ob auch der intrazelluläre Transport anderer hefespezifischer Toxine, wie z. B. K28 oder K1, durch das GFP-Fluoreszenz-Testsystem näher charakterisiert werden kann. Analog zu den RTA-Studien wurde *S. cerevisiae* BY4742 sowohl mit dem Killertoxin K28 als auch K1 behandelt und die Entwicklung der GFP-Fluoreszenz bestimmt. Im Gegensatz zu den RTA-Analysen wurde der pH-Wert des stabilisierten Leu-d/o-Mediums mit Hilfe eines McIlvaine-Puffers auf pH = 4,7 eingestellt, um optimale Bedingungen für K28 zu schaffen. Bei den Versuchen wurden die Hefesphäroplasten jeweils mit 100 µl K1 bzw. K28 (100-fach konzentrierte Kulturüberstände) behandelt (zur Verfügung gestellt von Thorsten Hoffmann). Im Vergleich zur Negativkontrolle führte die Behandlung mit K28 und K1 zu einer deutlichen Abnahme der GFP-Fluoreszenz (Abbildung 51). Bei der Negativkontrolle handelt es sich um Zellen, die mit 100 µl MacIlvaine-Puffer pH 4,7 behandelt wurden. Die Fluoreszenz von K28-behandelten Hefesphäroplasten betrug 52,7 %, wohingegen die Behandlung mit K1 eine Abnahme der Fluoreszenz auf 25,1 % verursachte.

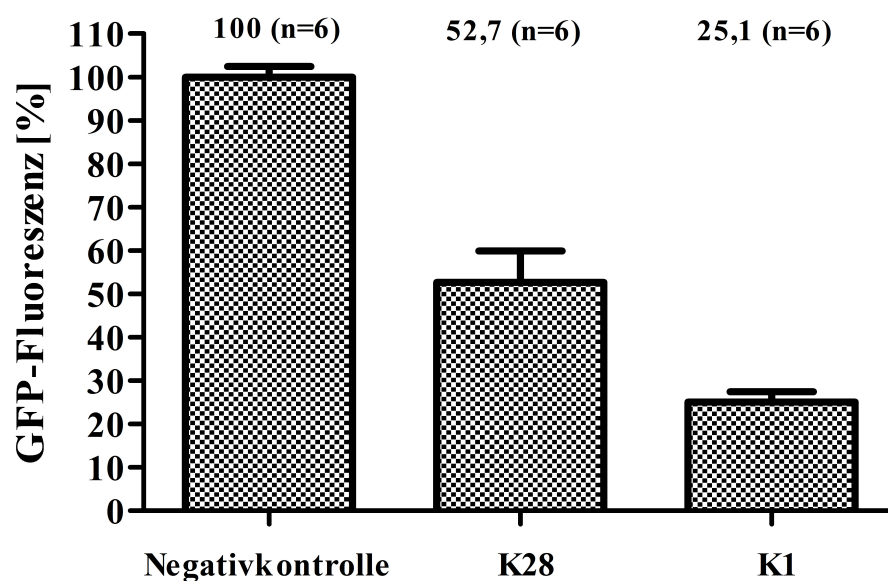


Abbildung 51: Hefesphäroplasten zeigen eine verringerte Fluoreszenz im GFP-Fluoreszenz-Testsystem nach Behandlung mit den Killertoxinen K28 und K1. *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit dem Reporterplasmid pRS315-K28_{SS}-GFP transformiert und die GFP-Fluoreszenz mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Tests in Anwesenheit von 100 µg einer 100-fach konzentrierten Probe von K28 bzw. K1 bzw. Negativkontrolle bestimmt. Die Mittelwerte (20 h-Messpunkt) sowie deren Standardabweichungen sind angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen dargestellt (n). Der Fluoreszenzwert der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

Die Resultate der beiden Toxine können jedoch nicht untereinander verglichen werden, da die eingesetzten Toxinkonzentrationen nicht identisch waren. Dennoch bestätigen die Daten, dass die Analyse des intrazellulären Transports von K28 und K1 mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Testsystems möglich ist.

3.7 Untersuchungen zum ER-Import von K28pp_{SS}-RTA in Hefen

Neben der Entwicklung innovativer hefebasierter Testsysteme wurde abschließend die intrazelluläre Expression von RTA in Hefen näher untersucht. In *S. cerevisiae* kann die ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA mit Hilfe eines artifiziellen Testsystems analysiert werden (Li *et al.*, 2011a; Simpson *et al.*, 1999). Dabei wird RTA durch ein N-terminales ER-Importsignal in das ER-Lumen dirigiert, wodurch eine *in vivo* Toxizität in Hefen hervorgerufen wird (Li *et al.*, 2011a; Lord *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 1999). Interessanterweise scheinen nicht alle potentiellen ER-Signalsequenzen einen effizienten Import von RTA in das ER zu gewährleisten. Zum Beispiel vermittelt die Signalsequenz des ER-luminalen Hefechaperons Kar2p einen effizienten Toxinimport, wobei das Anfügen der Prä-Signalsequenz des Killertoxins K28 zu keinem nachweisbaren Import von RTA in Hefen führt (Schnöder, 2009; Simpson *et al.*, 1999). Normalerweise sollte RTA wie auch im Fall des K28-Vorläufertoxins mit Hilfe dieser Signalsequenz posttranslational in das Hefe-ER transportiert werden (Riffer *et al.*, 2002). Zwar konnte ein vermindertes Wachstum nach intrazellulärer Expression von K28_{SS}-RTA in Hefezellen beobachtet werden, jedoch war der biochemische Nachweis des ER-Imports dieser Toxinvariante nicht möglich. Dennoch deutete die verminderte *in vivo* Toxizität in verschiedenen Mutanten mit Defekten im posttranslationalen ER-Import, im Signalpeptidase-Komplex sowie in zytosolischen Chaperon-Mutanten indirekt auf einen ER-Import von RTA hin (Schnöder, 2009). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die K28-Prä-Sequenz ungeeignet für den ER-Import von RTA ist. Im Gegensatz dazu konnten bereits andere Proteine, wie z. B. GFP, durch das Anfügen einer K28-Prä-Pro-Sequenz erfolgreich in das ER unterschiedlicher Hefegattungen importiert werden (Eiden-Plach *et al.*, 2004). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Prä-Pro-Signalsequenz von K28 (K28pp_{SS}) einen effizienteren Import von RTA in Hefen vermittelt.

3.7.1 Untersuchungen zur Toxizität von K28pp_{SS}-RTA in Hefen

Zunächst wurden zwei unterschiedliche Toxininfusionen konstruiert. Hierzu wurde die wildtypische bzw. mutierte RTA-Sequenz mit den jeweiligen SOE-Primern (Tabelle 10) aus dem Ausgangsplasmid pRS316-Kar2_{SP}-RTA bzw. pJC2433gem-pre_RTΔ_{delta} (Tabelle 5) amplifiziert. Parallel wurde auch die K28pp-Signalsequenz unter Verwendung der jeweiligen SOE-Primer aus dem Ausgangsplasmid pPGK-M28-I hergestellt (Tabelle 5). In einem zweiten Schritt wurde die Signalsequenz mit den unterschiedlichen RTA-Sequenzen mittels SOE-PCR fusioniert, wodurch die Konstrukte K28pp_{SS}-RTA bzw. K28pp_{SS}-RTA^{E177D} entstanden (Abbildung 52). Danach wurden beide Konstrukte mit *EcoRI* und *SalI* restringiert und in den Zentromervektor pRS316P_{Gal1}-Erd2.93-V5-Suc2A-His3CYC1TT (pRS316.PT) einkloniert. Die Konstrukte stehen dabei unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors, wodurch ihre intrazelluläre Expression reguliert werden kann.

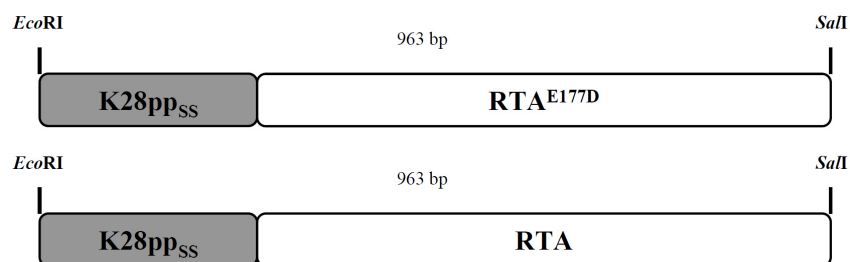


Abbildung 52: Konstrukte zur intrazellulären Expression von RTA in Hefen. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der 5'- bzw. 3'-Enden sowie die Basenanzahl der Konstrukte sind dargestellt. Die Fusionen wurden mittels PCR und SOE-PCR amplifiziert und anschließend durch *EcoRI/SalI*-Restriktion in den Zentromervektor pRS316.PT eingebracht.

Um die *in vivo* Toxizität der Konstrukte in Hefen zu bestätigen, wurde *S. cerevisiae* BY4742 mit den beiden Plasmiden transformiert (Punkt 2.8.2) und die toxische Wirkung im Wachstumstest (Punkt 2.14.1) analysiert. In Abbildung 53 sind beispielhaft die Resultate eines Wachstumstests dargestellt. Unter reprimierenden Bedingungen (Glukose) war bei beiden Konstrukten ein Wachstum bis zur geringsten Verdünnungsstufe zu beobachten. Auch unter induzierenden Bedingungen (Galaktose) war bei der mutierten RTA^{E177D}-Toxininfusion kein vermindertes Wachstum der Hefen zu erkennen. Die intrazelluläre Expression der wildtypischen RTA-Toxininfusion führte hingegen zu einer starken Wachstumshemmung, womit die *in vivo* Toxizität der wildtypischen RTA-Variante bestätigt werden konnte. Nur in den ersten zwei Verdünnungsstufen (10^6 und 10^5) war ein Zellwachstum zu erkennen. Der fehlende Toxizitätsnachweis der mutierten RTA^{E177D}-Variante ist wahrscheinlich auf dessen 50-fach reduzierte Aktivität zurückzuführen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete

Wachstumstest scheint nicht sensitiv genug zu sein, um schwache toxische Effekt der RTA^{E177D}-Variante zu detektieren. Die Resultate stehen zudem im Einklang mit früheren Arbeiten, bei denen ebenfalls kein vermindertes Wachstum nach Expression der mutierten K28_{SS}-RTA^{E177D} beobachtet werden konnte, wohingegen die wildtypische Variante K28_{SS}-RTA das Hefewachstum inhibierte (Schnöder, 2009).

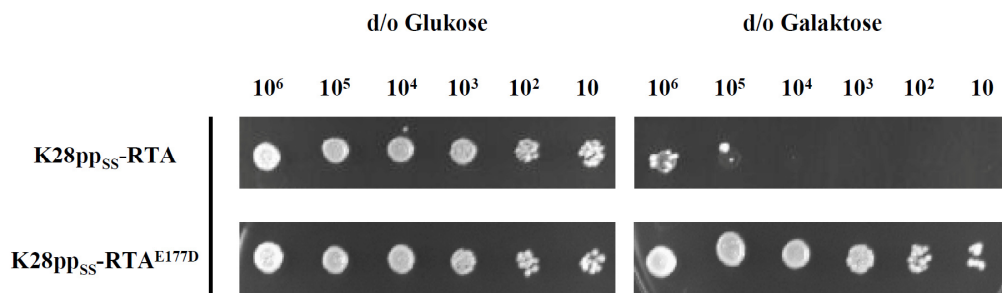


Abbildung 53: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in *S. cerevisiae* BY4742. Die eingesetzten Konstrukte wurden in den Zentromervektor pRS316.PT einkloniert, mit Hilfe der LiAc-Methode in die Hefe *S. cerevisiae* BY4742 eingebracht und anschließend ein Wachstumstest durchgeführt (Punkt 2.14.1). Es wurden 1×10^7 Hefezellen geerntet und in 50 μ l Ura-d/o-Raffinose-Medium aufgenommen und eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 μ l auf Ura-d/o-Platten mit Glukose (reprimierende Bedingungen, links) und Galaktose (induzierende Bedingungen, rechts) aufgetropft, die Platten 5 d bei 30°C inkubiert und abschließend das Zellwachstum analysiert.

3.7.2 *In vitro* Translation der verschiedenen RTA-Varianten

Da es mit Hilfe der konventionellen Western-Analyse nicht möglich ist, die Expression verschiedener RTA-Fusionen in Hefen nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit die radioaktive Proteinmarkierung eingesetzt. Diese deutlich sensitivere Methode wurde bereits von Schnöder (2009) zur Detektion von RTA in Hefen eingesetzt und ist besonders für den Nachweis von geringen Proteinmengen geeignet. Um in den späteren radioaktiven Markierungsexperimenten die korrekte Detektion der *in vivo* translatierten Toxinbanden zu erleichtern, wurden in einem Vorversuch sowohl eine zytosolisch exprimierte RTA-Variante (Schnöder, 2009) als auch ein RTA-Konstrukt mit K28pp-Signalpeptid am N-Terminus *in vitro* transkribiert und translatiert (Punkt 2.13). Anschließend wurden die Ansätze in einer SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Phosphoimager analysiert und mit einem mitgeführten C¹⁴-markierten Proteinstandard verglichen (Punkt 2.12.3). Da den meisten DNA-Molekülen eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle fehlt, wurde die gewünschte DNA zuvor in den Vektor pJC2433gem-pre_RTΔ einkloniert. Dieser verfügt über eine derartige Bindungsstelle und kann zur *in vitro* Transkription eingesetzt werden. Für alle weiteren radioaktiven

Markierungsexperimente wurden lediglich die abgeschwächten Toxinkonstrukte RTA^{E177D} und K28pp_{SS}-RTA^{E177D} eingesetzt, da diese RTA-Varianten deutlich weniger toxisch für die Hefezellen sind als die entsprechenden wildtypischen RTA-Konstrukte. Die in Abbildung 54 dargestellten RTA^{E177D}-Derivate wurden in den „multi-copy“-Vektor 2433gem-pre_RTΔ (Tabelle 6) inkloniert und zur *in vitro* Transkription/Translation eingesetzt.

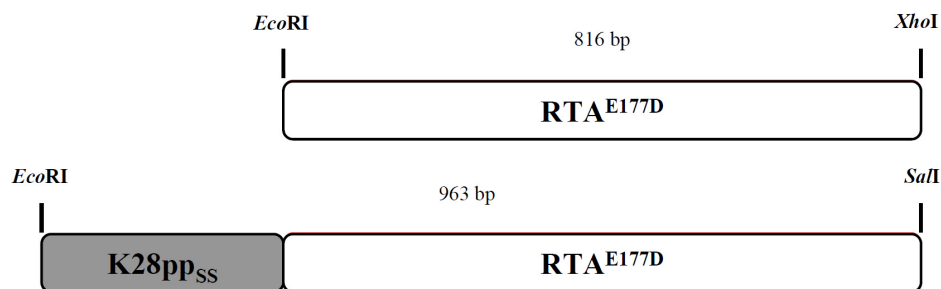


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Konstrukte zur *in vitro* Transkription und Translation in Hefen. Die Restriktionsschnittstellen der 5'- bzw. 3'-Enden sowie die Basenzahl der Konstrukte sind dargestellt. Die Fusionen wurden mittels PCR und SOE-PCR amplifiziert und RTA^{E177D} durch *EcoRI/XhoI*-Restriktion bzw. K28pp_{SS}-RTA^{E177D} durch *EcoRI/SalI*-Restriktion in den „multi-copy“-Vektor pJC2433gem-pre_RTΔ eingebracht.

Die einzelnen RTA^{E177D}-Varianten konnten nach der *in vitro* Synthese im Phosphoimager nachgewiesen werden (Abbildung 55). Wie erwartet, lief die Bande von zytosolischem RTA^{E177D} auf der Höhe von ca. 32 kDa, während bei dem Konstrukt mit K28-Prä-Pro-Signalpeptid (K28pp_{SS}-RTA^{E177D}) eine Bande bei ca. 37,2 kDa zu erkennen war.

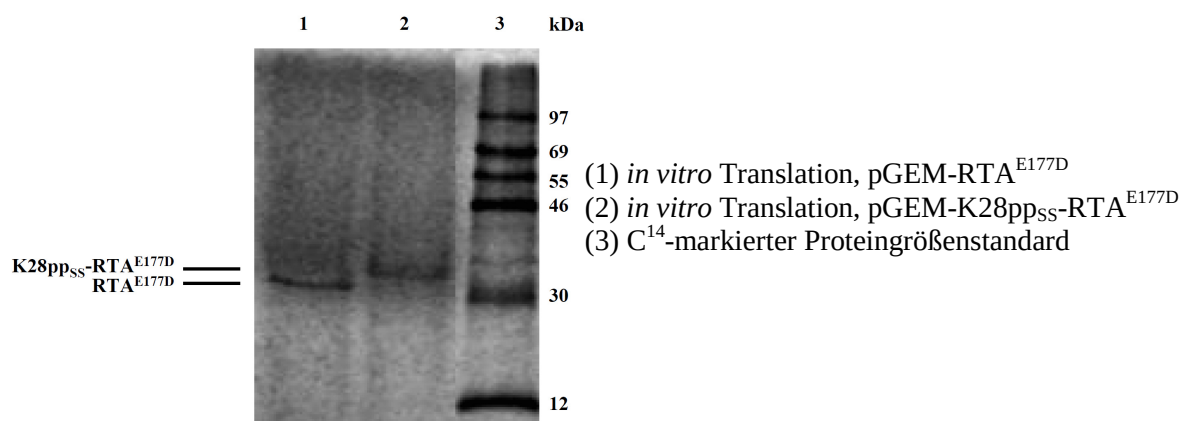


Abbildung 55: Nachweis der verschiedenen *in vitro* translatierten RTA^{E177D}-Varianten mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging. pGem-RTA^{E177D} bzw. pGem-K28pp_{SS}-RTA^{E177D} wurden zunächst durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert und die DNA anschließend mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol präzipitiert. Danach wurde die DNA zur *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach der *in vitro* Translation wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und 72 h in einer Exponierkassette exponiert, bevor das Gel im Phosphoimager analysiert wurde.

3.7.3 Markierungsexperimente („Pulse-Labeling“) zum Nachweis des ER-Imports

Nachdem die genaue Bandengröße von unprozessiertem K28pp_{SS}-RTA^{E177D} *in vitro* bestätigt werden konnte, wurde im Folgenden der ER-Import der Toxinvariante *in vivo* charakterisiert. Um einen Größenvergleich zu haben, wurde die *in vitro* translatierte Probe von pGEM-K28pp_{SS}-RTA^{E177D} als Größenstandard mitgeführt. Zur Charakterisierung des ER-Imports von RTA wurde *S. cerevisiae* BY4742 mit dem Plasmid pRS316-K28pp_{SS}-RTA^{E177D} transformiert und die Zellen nach dem in Punkt 2.12.1 beschriebenen Protokoll radioaktiv markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen lysiert, RTA mittels Anti-RTA-Antikörpern immunpräzipitiert und der Glykosylierungszustand durch EndoH-Behandlung überprüft. Das Enzym spaltet die Bindung zwischen zwei N-Acetylglukosamin-Molekülen und entfernt somit vorhandene Glykosylierungen an Proteinen, wodurch eine mögliche Glykosylierung von RTA nachgewiesen werden kann. Der Nachweis der Glykosylierung stellt wiederum ein indirektes Indiz für den ER-Import des Toxins dar, da diese Modifikation nur im ER erfolgen kann. Die Detektion der Toxinbanden erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender direkter Autoradiographie.

Da aus früheren Untersuchungen bekannt ist, dass eine *in vivo* Expression von pRS316-Kar2-RTA^{E177D} in Hefen zu einem effektiven ER-Import von RTA führt, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der ER-Import einer Kar2-RTA^{E177D}-Variante analysiert (Schnöder, 2009; Simpson *et al.*, 1999). Das verwendete Plasmid pRS316-Kar2-RTA^{E177D} stammt aus der Arbeit von Schnöder (2009). Wie in Abbildung 56 zu sehen ist, konnten zwei immunreaktive Toxinbanden nachgewiesen werden. Bei der unteren Bande handelt es sich um nicht-glykosyliertes, prozessiertes RTA, während die obere Bande glykosyliertem, prozessiertem RTA entspricht (Simpson *et al.*, 1999). Die Behandlung mit EndoH führte zu einem Shift der oberen, glykosylierten RTA-Bande auf die Höhe von unglykosyliertem, prozessiertem RTA, wodurch ein ER-Import der Variante eindeutig bestätigt werden konnte.

Bei dem Konstrukte K28-RTA^{E177D} war hingegen nur eine einzelne immunreaktive Bande zu erkennen, die auf Höhe der *in vitro* Probe lief (Abbildung 57). Nach EndoH-Behandlung konnte keine Verringerung der Bandengröße beobachtet werden, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei der detektierten Bande um die unprozessierte Toxinvariante vor dem Eintritt in das ER handelt. Aufgrund der fehlenden Glykosylierung der Bande kann auch ein effektiver ER-Import wie im Falle von Kar2-RTA^{E177D} ausgeschlossen werden. Auch die Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG132, wodurch ein zu rascher Abbau der glykosylierten RTA-Form verhindert werden sollte, brachte keine Verbesserung der Ergebnisse (Abbildung 57)

Die beobachteten Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Schnöder (2009) überein, in denen auch kein effizienter Import von RTA mit Hilfe einer N-terminalen K28-Prä-Signalsequenz erzielt werden konnte.

Insgesamt führte auch die Verwendung der K28-Prä-Pro-Region zu keiner sichtbaren Verbesserung des Toxinimports in das ER. Sowohl die Glykosylierung als auch die Abspaltung der Signalsequenz konnte nicht nachgewiesen werden. Der sensitive Phänotyp von wildtypischen BY4742-Zellen gegenüber K28pp_{SS}-RTA lässt jedoch vermuten, dass ein Teil des Toxins in das ER-Lumen eintritt und wieder transloziert wird, um im Zytosol seine toxische Wirkung zu entfalten. Es können jedoch nur sehr wenige Toxinmoleküle sein, da sie trotz der sensitiven Markierungsmethode nicht nachgewiesen werden konnten.

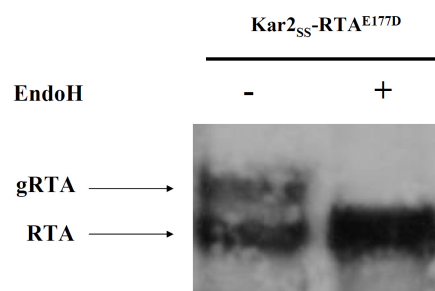


Abbildung 56: Nachweis des ER-Imports von Kar2-RTA in *S. cerevisiae* BY4742. Hefezellen wurden mit dem Konstrukt pRS316-Kar2-RTA^{E177D} (Tabelle 6) transformiert und die Zellen nach dem in Punkt 2.12.1 beschriebenen Protokoll radioaktiv markiert. Nach dem „Labeling“ wurden die Zellen lysiert und die RTA-Moleküle mit Anti-RTA-Antikörper immunpräzipitiert. Danach wurde die Probe gesplittet und 3 h bei 37°C in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von EndoH inkubiert und zur SDS-PAGE eingesetzt (Punkt 2.12.4). Die Detektion der Proben erfolgte mittels direkter Autoradiographie (Punkt 2.12.2). (gRTA = glykosyliert, prozessierte Form; RTA = unglykosyliert, prozessierte Form)

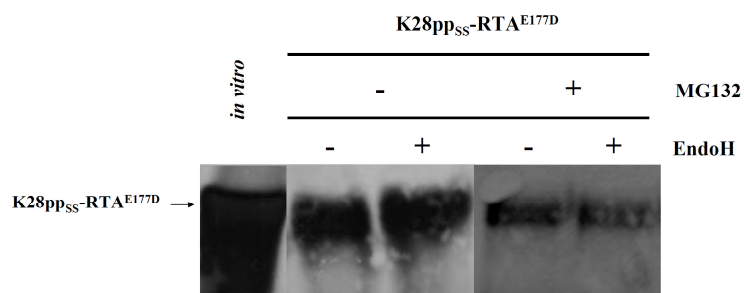


Abbildung 57: Nachweis des ER-Imports von K28pp_{SS}-RTA in *S. cerevisiae* BY4742. *S. cerevisiae* BY4742 bzw. *Δise1*-Zellen (MG132-Behandlung) wurden mit dem Konstrukt pRS316-K28pp_{SS}-RTA^{E177D} (Tabelle 6) transformiert, die Zellen in Anwesenheit (+) bzw. in Abwesenheit (-) des Proteasomeninhibitors MG132 (Punkt 2.12.5) kultiviert und anschließend nach dem in Punkt 2.12.1 beschriebenen Protokoll radioaktiv markiert. Nach dem „Labeling“ wurden die Zellen lysiert und die RTA-Moleküle mit Anti-RTA-Antikörper immunpräzipitiert. Danach wurde die Probe gesplittet und 3 h bei 37°C in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von EndoH inkubiert und zur SDS-PAGE eingesetzt (Punkt 2.12.4). Die Detektion der Proben erfolgte mittels direkter Autoradiographie (Punkt 2.12.2). Zum Größenvergleich der entsprechenden *in vivo* Proben wurde die *in vitro* translatierte Probe von K28pp_{SS}-RTA^{E177D} (*in vitro*, Spur 1) mitgeführt.

4. Diskussion

Der intrazelluläre Transport in eukaryotischen Zellen beinhaltet ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen retrograden und anterograden Transportmechanismen sowie deren Regulatoren. Dabei entsteht ein Fließgleichgewicht zwischen den einzelnen Transportwegen, wodurch die Zusammensetzungen sowie die Funktionen der zellulären Kompartimente gewährleistet werden (Bonifacino und Rojas, 2006). Bei der Intoxifikation von Zellen durch bakterielle und pflanzliche A/B-Toxine spielen genau diese zelleigenen, retrograden Transportwege eine entscheidende Rolle (Sandvig *et al.*, 1992; Sandvig *et al.*, 2004). Im Allgemeinen binden die Mitglieder der A/B-Toxin-Familie mit Hilfe ihrer B-Untereinheit an die Oberfläche der Zielzelle. Danach wird eine Vielzahl von Toxinen, darunter auch das Shiga-Toxin, retrograd in das ER transportiert, wobei die B-Untereinheit teilweise auch am intrazellulären Toxintransport beteiligt ist (Sandvig *et al.*, 1992). Die A-Untereinheit hingegen stellt die toxische Komponente dar, die ihre Wirkung meistens im Zytosol der Zielzelle entfaltet. Im Laufe der Evolution haben die verschiedenen Toxine unterschiedlichste Mechanismen entwickelt, um nach der Zellbindung in das Zytosol der Zielzellen zu gelangen (Falnes und Sandvig, 2000). Das Diphtherie-Toxin sowie der Letal- oder Edema-Faktor des Anthrax-Toxins können bereits aus frühen endosomalen Kompartimenten in das Zytosol dislozieren, wobei die A-Untereinheiten von Ricin oder des Pertussis- und Cholera-Toxins erst aus dem ER in das Zytosol retrotranslozieren (Abrami *et al.*, 2005; Falnes und Sandvig, 2000). Nur ein genaues Verständnis über Toxinaufnahme und -transport können dazu beitragen, die unterschiedlichen Intoxifikationswege mit neuartigen Inhibitoren zu blockieren sowie effiziente Therapienansätze gegen die jeweiligen Toxine zu etablieren. Andererseits kann die medizinische Forschung vom Potential vieler Toxine profitieren und sich deren Eigenschaften zur Bekämpfung von menschlichen Krankheiten, wie z. B. Krebs, zu Nutze machen (Turturro, 2007). In diesem Zusammenhang konnten bereits fokale Dystonien oder Hyperhydrosis durch die Verwendung des hochtoxischen Botulinum-Toxins gelindert werden (Kostrzewa und Segura-Aguilar, 2007). Neben den Anwendungen in der Medizin werden die A/B-Toxine in der Forschung auch als Modelle eingesetzt, um die weitestgehend unbekannten retrograden Transportmechanismen genauer zu analysieren.

Auch bei dem Pflanzentoxin Ricin handelt es sich um ein A/B-Toxin, welches retrograd vom Endosom über den Golgi-Apparat zum ER transportiert wird (Rapak *et al.*, 1997). Nach der ER-Retrotranslokation der A-Untereinheit kommt es im Zytosol zur spezifischen

Depurinierung der 28S rRNA eukaryotischer Ribosomen, was zur Hemmung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod führt (Hartley und Lord, 2004a). Obwohl die Struktur und Wirkweise von Ricin weitestgehend verstanden sind, ist relativ wenig über dessen retrograden Transportmechanismus bekannt. Wie auch bei anderen A/B-Toxinen ist die B-Untereinheit von Ricin für die Zellbindung und den retrograden Toxintransport zuständig (Sandvig *et al.*, 1978). Erstaunlicherweise ist RTA auch ohne RTB in der Lage, in das Zytosol der Zielzelle zu gelangen und die Proteinbiosynthese zu inhibieren (Wales *et al.*, 1993). Die *in vivo* Toxizität von RTA kann zudem durch die Fusion des ER-Retentionssignals KDEL erhöht werden (MacDonald *et al.*, 2005). Normalerweise besitzen lösliche ER-residente Proteine derartige Retentionsmotive, um effizient in das ER zurück transportiert zu werden. Solch ein Rückhaltemechanismus konnte bereits in einer Reihe von Organismen, wie z. B. Pflanzen, Hefen und dem Mensch, identifiziert werden, wobei die erkannten Signale in den einzelnen Organismen variieren können (Lewis *et al.*, 1990; Napier *et al.*, 1992). In Hefen vermittelt der essentielle Membranrezeptor Erd2p den ER-Rücktransport HDEL-tragender Proteine (Semenza *et al.*, 1990). In Säugerzellen existieren nach heutigem Stand drei KDEL-Rezeptoren, welche unterschiedliche Spezifitäten besitzen und eine Reihe weiterer Motive, darunter HDEL, REEL oder PGEL, erkennen (Raykhel *et al.*, 2007). Eventuell ist die gesteigerte *in vivo* Toxizität von RTA^{KDEL} auf eine Interaktion mit einem der drei KDEL-Rezeptoren zurückzuführen. Bislang handelt es sich dabei jedoch nur um Vermutungen, da die retrograden Transportrouten von RTA und RTA^{KDEL} sowie deren Retrotranslokation in das Zytosol weitestgehend unbekannt sind.

Daher bestand das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit einerseits darin, dass Verständnis über den intrazellulären Transport verschiedener RTA-Varianten in Säugerzellen zu erweitern und andererseits innovative *in vivo* Testsysteme zur Analyse des retrograden Transports von RTA im Modellorganismus *S. cerevisiae* zu entwickeln, wobei die gewonnenen Resultate bei der künftigen Entwicklung neuer Therapieansätze helfen sollen. Zunächst konnten unterschiedliche Toxinvarianten heterolog in *E. coli* exprimiert und deren biologische Aktivität in Säuger- und Hefezellen verifiziert werden. In weiterführenden Untersuchungen konnten weitere Indizien für die Beteiligung von Sec61α an der ER-Retrotranslokation von RTA^{HDEL} bzw RTA^{KDEL} gesammelt werden. Parallel konnten auch eGFP-markierte Toxinvarianten hergestellt werden, die eine zukünftige Visualisierung der Toxinaufnahme erlauben sollte und erste Hinweise für eine Interaktion zwischen RTA^{HDEL} und dem HDEL-Rezeptor Erd23 im Säuger lieferten. Abschließend konnte mit Hilfe der neuentwickelten *in vivo* Testsysteme erstmals ein umfangreiches Modell zum retrograden Transport von RTA

in Hefen postuliert werden, das starke Ähnlichkeiten zum Ricin-Transport im Säuger aufweist.

Herstellung unterschiedlich modifizierter RTA-Varianten

Die Grundlage für eine Untersuchung der Endozytose und des retrograden Transports verschiedener RTA-Varianten in Säuger- und Hefezellen ist die Produktion ausreichender Mengen an reinen, aktiven Toxinvarianten. Seit den 70er Jahren ist die heterologe Expression von Fremdproteinen im *E. coli* Expressionssystem sehr populär und wird häufig eingesetzt. Der Expressionswirt vereint eine kostengünstige und schnelle Produktion mit einer hohen Syntheserate. Noch heute werden viele biotechnologisch relevanten Proteine, wie z. B. Lipasen und Oxidasen, aber auch säugerspezifische Hormone im großen Maßstab in diesem Wirt hergestellt (Akbari *et al.*, 2010; Itakura *et al.*, 1977; Martinez-Martinez *et al.*, 2007). Auch verschiedene Untereinheiten von A/B-Toxinen, wie etwa die A-Untereinheit von Ricin, die B-Untereinheit des Cholera-Toxins oder der Edem-Faktor des Anthrax-Toxins, konnten bereits in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aus dem Zelllysat gereinigt werden (Dong *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1991; Wales *et al.*, 1992).

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen wildtypischen und mutierten RTA-Toxinkonstrukte in den pET-Expressionsvektor eingebracht und deren intrazelluläre Expression in *E. coli* charakterisiert. Durch Optimierung der verschiedenen Expressionsparameter konnten sowohl die wildtypischen Toxinvarianten (RTA_{His}, RTA_{His}^{HDEL} und RTA_{His}^{KDEL}) als auch die entsprechenden mutierten Toxinvarianten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Die vielversprechendsten Expressionsergebnisse konnten bei einer Temperatur von 28°C und einer IPTG-Konzentration von 1 mM erzielt werden. Bei höheren Temperaturen konnte eine Zunahme der Proteinaggregation festgestellt werden. Das Auftreten von „inclusion bodies“ ist bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* keine Seltenheit. Das Phänomen trat auch bei der Expression des *Microcystis viridis* Lectins auf; bei 37°C war das Protein in der Pellet-Fraktion zu finden, wohingegen bei 23°C eine lösliche Form nachweisbar war (Li *et al.*, 2011b). Zudem haben die Untersuchungen gezeigt, dass eine Inkubationsdauer von 2 h bis 6 h nicht überschritten werden sollte. Die Erhöhung der Induktionszeiten wirkte sich ebenfalls negativ auf die Toxinexpression aus; sowohl im Pellet als auch Überstand konnten nach 24-stündiger Expression keine Toxinbanden der jeweiligen Varianten mehr nachgewiesen werden. Die Veränderung der IPTG-Konzentrationen zeigte keine nennenswerten Unterschiede in den Expressionsraten. Die Parameter stellen dabei einen Kompromiss aus

ausreichender Toxinproduktion und minimaler Aggregat-Bildung dar. Die in der vorliegenden Arbeit optimierten Bedingungen zur Expression von RTA ähneln bereits früher ermittelten Expressionsparametern (Wales *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2005). Ebenso sind die erhaltenen Resultate vergleichbar mit RTA-Expressionsversuchen in *E. coli*; so waren Wales *et al.* (1993) in der Lage, biologisch aktives RTA und RTA^{KDEL} mit Hilfe von *E. coli* herzustellen. Zhan *et al.* (2004) und Wang *et al.* (2005) stellten ebenfalls RTA und RTA^{KDEL} im größeren Maßstab in *E. coli* her. Die rekombinante Expression von RTA_{His}^{HDEL} sowie der mutierten Toxinvarianten konnte jedoch erstmals in der vorliegenden Arbeit beschrieben und etabliert werden.

Durch die anschließende Affinitätschromatographie war es möglich, alle unterschiedlichen Toxinvarianten mittels N-terminalen His₆-Tags aus den Zelllysaten zu reinigen. Mit dieser Methode wurden bereits unterschiedliche Proteine, darunter auch Toxin-Untereinheiten wie z. B. Botulinum- und Diphtherie-Toxin, aus *E. coli* Lysaten isoliert (Agarwal *et al.*, 2004; Stefan *et al.*, 2010). Die erhaltenen Reinheiten von ca. 90-95 % sowie die Toxinkonzentrationen von bis zu 50 mg/l nach der Reinigung sind vergleichbar mit früheren Arbeiten, bei denen Reinheiten von 90 % und RTA-Expressionsraten von ca. 60 mg/l in *E. coli* erreicht wurden (Wang *et al.*, 2005). Um die Toxinausbeuten noch weiter zu erhöhen, wäre in Zukunft eine kontrollierte Kultivierung im Bioreaktor vorstellbar. Darin könnten die optimalen Kulturbedingungen über den kompletten Expressionszeitraum konstant gehalten und Schwankungen, wie sie im Schüttelkolben auftreten, verhindert werden, wodurch eine eventuelle Steigerung der Proteinausbeute auf mehrere g/l wie im Fall der B-Untereinheit des Cholera-Toxins möglich wäre (Ma *et al.*, 1991).

Entscheidend für die weiterführenden Untersuchungen zur Endozytose und zum intrazellulären Transport war die Überprüfung der biologischen Aktivität der gereinigten RTA-Varianten. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die in *E. coli* rekombinant exprimierten Toxinuntereinheiten eine native und funktionelle Konformation besitzen, wodurch eine Analyse des intrazellulären Transports erst möglich ist. Die *in vivo* Toxizität von Chemikalien, Arzneimitteln oder auch Toxinen wird meist indirekt durch die Bestimmung der Zellvitalität ermittelt. Der Nachweis der Vitalität kann dabei über die Aktivität verschiedener Enzyme, wie z. B. Reduktasen oder Dehydrogenasen bestimmt werden (Decker und Lohmann-Matthes, 1988; Gerlier und Thomasset, 1986; Nakayama *et al.*, 1997). Auch die Messung der Respiration wird häufig zur Analyse der Vitalität von Mikroorganismen und Säugerzellen eingesetzt (Deshpande und Heinzle, 2004; John *et al.*, 2003). Des Weiteren können auch lebende und tote Zellen durch Färbemethoden wie z. B.

Trypanblau-Färbung voneinander unterschieden werden (Louis und Siegel, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo* Toxizität von RTA^{KDEL} durch verschiedene Nachweismethoden, darunter Trypanblau-Färbung, enzymbasierte Toxizitätstests (WST-1 und XTT) und Phasenkontrastmikroskopie belegt. Es konnten sowohl eine Veränderung der Zellmorphologie als auch eine Abnahme der Zellvitalität von HeLa- und HEK293T-Zellen beobachtet werden. Die Resultate stimmen mit früheren Untersuchungen überein, in denen die *in vivo* Toxizität von RTA^{KDEL} in HeLa-, MCF-, Jurkart- und Vero-Zellen gezeigt werden konnte (Wales *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1998). Ebenso konnte bestätigt werden, dass durch die C-terminale Fusion eines HDEL-Retentionssignals die *in vivo* Toxizität von RTA gesteigert wird. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl RTA^{KDEL} als auch RTA^{HDEL} einen ähnlich toxischen Effekt gegenüber HeLa-Zellen vermitteln (Becker und Schmitt, 2011). Beide Toxinvarianten zeigten eine vergleichbare dosis- und zeitabhängige Verringerung der Zellvitalität bei HeLa-Zellen. Da sich RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} lediglich in einer Aminosäure im Retentionsmotiv unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass sie wahrscheinlich einen ähnlichen Transportmechanismus nutzen, um das Zytosol der Zielzelle zu erreichen. Wie bereits beschrieben (siehe Einleitung 1.3), existiert in Säugerzellen ein spezieller Rückhaltemechanismus, der den retrograden Transport ER-residenter Proteine vermittelt. Bislang sind drei KDEL-Rezeptoren in Säugerzellen bekannt, die unterschiedliche Präferenzen für die jeweiligen ER-Retentionssignale besitzen (Lewis und Pelham, 1990; Lewis und Pelham, 1992; Raykhel *et al.*, 2007). Erd21 und Erd22 binden dabei bevorzugt KDEL-tragende Proteine, wohingegen Erd23 vornehmlich HDEL-tragende Proteine erkennt (Raykhel *et al.*, 2007). Es ist vorstellbar, dass die Toxinvarianten mit zusätzlichem ER-Retentionssignal im Gegensatz zu unmodifiziertem RTA an einen oder mehrere dieser Rezeptoren binden und dadurch effizienter in das ER transportiert werden können. Diese Vermutung impliziert jedoch, dass RTA alleine eine deutlich verringerte *in vivo* Toxizität besitzen sollte als RTA^{KDEL} und RTA^{HDEL}. Wales *et al.* (1993) konnten zeigen, dass unmodifiziertes RTA im Vergleich zu RTA^{KDEL} eine bis um das 250-Fache verringerte Hemmung der Proteinsynthese in Vero-Zellen induziert. Auch die gesteigerte Toxizität von RTA^{HDEL} unterstützt diese Annahme. Bei hohen Konzentrationen (100 µg/ml) kann auch RTA eine vergleichbare Inhibierung der Proteinbiosynthese wie RTA^{KDEL} induzieren (Wales *et al.*, 1993). RTA scheint daher deutlich ineffizienter das Zytosol der Zielzelle zu erreichen und ist im Unterschied zu RTA^{KDEL} erst bei hohen Toxindosen in der Lage, die Ribosomen im Zytosol effizient zu inaktivieren. Der Zusammenhang zwischen KDEL-Rezeptoren und

Toxinwirkung wird zu einem späteren Zeitpunkt der Diskussion nochmals ausführlich angesprochen.

Auch in der vorliegenden Arbeit induzierte die Behandlung mit RTA einen deutlich schwächeren Effekt auf die Zellmorphologie und Zellvitalität von HeLa-Zellen als die Behandlung mit RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL}. Allerdings konnte auch bei sehr hohen RTA-Konzentrationen (160 µg/ml) nur ein schwacher toxischer Effekt beobachtet werden. In früheren Arbeiten konnte ebenfalls kein toxischer Effekt bei geringeren Toxindosen von unmodifiziertem RTA auf HeLa-Zellen beobachtet werden (Wang *et al.*, 2010). Zum Nachweis der RTA-Toxizität wurden in beiden Fällen enzymbasierte Vitalitätsassays eingesetzt. Wales *et al.* (1993) bestimmten die *in vivo* Toxizität von RTA und RTA^{KDEL} durch Messung der Proteinsynthesehemmung. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem im direkten und schnelleren Nachweis der Toxizität (4 h), wobei bei den enzymbasierten Tests der Nachweis nur indirekt über die Messung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität erfolgen kann. In der vorliegenden Arbeit war deshalb erst nach 24 h eine signifikante Abnahme der Zellvitalität in HeLa-Zellen zu beobachten. Möglicherweise kommt es durch die RTA-Behandlung zwar zur Hemmung der Proteinbiosynthese, jedoch reicht der ineffiziente Transport von RTA zum Wirkungsort nicht aus, um eine effiziente und schnelle Abtötung der Zellen zu induzieren, wodurch der indirekte Nachweis über die Zellvitalität in Zellen ausbleibt. Das enzymbasierte Testsystem hat zudem den Nachteil, dass die mitochondrialen Dehydrogenasen auch nach dem Absterben der Säugerzellen noch über einen nicht unerheblich langen Zeitraum in der Lage sind, das Substrat umzusetzen. Ein weiteres Indiz für diese Vermutung lieferte die Beobachtung, dass Hefesphäroplasten sensitiv gegenüber extern appliziertem RTA waren und durch die Behandlung abstarben. Der toxische Effekt von RTA konnte in drei unterschiedlichen, nicht-enzymbasierten Testsystemen detektiert und somit die biologische Aktivität von unmodifiziertem RTA belegt werden (vgl. Punkt 3.5 und 3.6). Insgesamt konnten somit alle Voraussetzungen etabliert werden, um hochreine, biologisch aktive RTA-Varianten in ausreichender Menge in *E. coli* zu produzieren.

Um zukünftig die *in vivo* Toxizität der verschiedenen RTA-Varianten in Säugerzellen besser nachweisen zu können, wäre eine Etablierung der von Wales *et al.* (1993) beschriebenen Nachweismethode zu empfehlen. Damit sollte es möglich sein, sowohl die biologische Aktivität der KDEL- und HDEL-Konstrukte als auch die von unmodifiziertem RTA zu bestätigen. Ein weiterer Vorteil läge in der früheren zeitlichen Detektion der Toxizität. Beim enzymatischen Nachweis konnte dieser erst nach ca. 24 h erfolgen, wohingegen die

Proteinhemmung bereits nach 4 h messbar ist (Wales *et al.*, 1993). Zusätzlich könnten die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren, wie z. B. der Golgi-Inhibitoren Golgicide A oder Exo-2, auf die *in vivo* Toxizität der einzelnen RTA-Varianten durch einen früheren zeitlichen Toxizitätsnachweis analysiert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden sind hierfür jedoch ungeeignet, da eine 24-stündige Behandlung von HeLa-Zellen mit Golgicide A bereits eine starke Reduzierung der Zellvitalität um ca. 50 % induziert (Domenik Rammo, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand des Vergleichs von wildtypischen und mutierten RTA-Varianten bestätigt werden, dass ein Verlust der katalytischen RTA-Aktivität auch zu einer geringeren *in vivo* Toxizität führt. Bislang wurde deren Auswirkung lediglich im Hefemodell oder *in vitro* charakterisiert (Allen *et al.*, 2007; Day *et al.*, 1996; Schnöder, 2009). Die fehlenden Unterschiede in der Toxizität von mutierten, KDEL- bzw. HDEL-tragenden Toxinvarianten stehen ebenfalls im Einklang mit den Resultaten der wildtypischen RTA-Varianten RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL}. Aufgrund ihrer schwächeren *in vivo* Toxizität stellen sie zudem vielversprechende Kandidaten dar, um in zukünftigen Interaktionsstudien bzw. Untersuchungen zum intrazellulären Transport verwendet werden zu können. Oftmals besteht die Problematik solcher Studien darin, dass wildtypisches RTA eine zu starke Toxizität besitzt, um phänotypische und biochemische Unterschiede detektieren zu können. So kann beispielsweise die Untersuchung der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA in Hefen nur mit Hilfe abgeschwächter RTA-Mutanten erfolgen (Li *et al.*, 2011a). Außerdem können abgeschwächte Toxine dazu beitragen, die Beteiligung von Proteinen, die nur einen schwachen Einfluss auf den Intoxifikationsmechanismus haben, nachzuweisen (Schnöder, 2009).

Ebenso wäre die Etablierung eines von Sturm und Schramm (2009) oder Chaddock und Roberts (1993) beschriebenen *in vitro* Testsystems sinnvoll, um zukünftig die biologische Aktivität der rekombinant exprimierten Toxinvarianten bestimmen zu können. Damit könnte sichergestellt werden, dass die beobachteten Zellvitalitäten nach Behandlung mit identischen Toxindosen nicht auf unterschiedliche biologische Aktivitäten der einzelnen RTA-Varianten zurückzuführen sind. Des Weiteren könnten auch mögliche negative Auswirkungen der rekombinanten Expression, affinitätschromatographischen Reinigung und Umpufferung analysiert werden. Da erst bei hohen Toxinkonzentrationen von 160 µg/ml eine Verringerung der Zellvitalität um ca. 70 % zu verzeichnen war, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die katalytische Aktivität der rekombinanten Toxinvarianten weitaus geringer ist als bei nativem Ricin.

Biochemischer Nachweis der Toxinaufnahme

Durch den Nachweis der *in vivo* Toxizität von KDEL- und HDEL-tragenden Toxinvarianten konnte indirekt belegt werden, dass beide RTA-Varianten von Zielzellen aufgenommen und bis in das Zytosol transportiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch der direkte biochemische Nachweis der Toxinaufnahme mittels Western-Analyse nicht erbracht werden. Bei Toxin-behandelten HeLa-Zellen waren sowohl nach Detektion mit Anti-RTA-Antikörpern als auch mit Anti-His-Antikörpern keine Signale bei ca. 31 kDa in den Zelllysaten zu erkennen. Auch nach Erhöhung der eingesetzten Zellzahl auf 4×10^6 Zellen sowie nach Verwendung des Proteasomeninhibitors MG132 waren keine RTA-Banden detektierbar. Die Resultate deuten darauf hin, dass die Western-Analyse nicht sensitiv genug ist, um die geringe internalisierte Toxinmenge zu detektieren. Van Deurs *et al.* (1988) konnten bereits zeigen, dass nur ca. 5 % (entspricht ca. $6-8 \times 10^4$ Zellen) der endozytierten Ricin-Moleküle den Golgi-Apparat erreichen und die restlichen Toxinmoleküle entweder exozytiert oder im Lysosom degradiert werden. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der fehlenden RTB-Untereinheit keine spezifische Bindung der RTA-Varianten an die Plasmamembran stattfindet, wodurch die endozytierte Toxinmenge deutlich verringert ist. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen scheint die Sensitivität der Western-Analyse nicht auszureichen, um ein RTA-Toxinsignal nachzuweisen. Die Resultate stehen auch im Einklang mit der Literatur, in der bislang ebenfalls kein biochemischer Nachweis von Ricin mittels Western-Analyse beschrieben ist. Auch Schnöder (2009) war nicht in der Lage, die intrazelluläre Expression von K28-RTA und K28-RTA^{E177D} mittels Western-Analyse in Hefen nachzuweisen, obwohl dabei die Toxinmenge im Vergleich zur natürlichen Intoxifikation erhöht sein sollte. Eventuell findet in Hefen eine schnelle Degradation der RTA-Moleküle statt, wodurch deren Menge ebenfalls unter der Nachweisgrenze bleibt.

Um künftig die Toxinaufnahme und den intrazellulären Transport der RTA-Varianten näher zu charakterisieren, wäre eine nachträgliche radioaktive Markierung der gereinigten Toxinvarianten eine vielversprechende Alternative. In mehreren früheren Studien konnten die Endozytose sowie der retrograde Transport von Ricin mit Hilfe von radioaktivem Iod analysiert und beschrieben werden (Chazaud *et al.*, 1995; Klock *et al.*, 2011; Rapak *et al.*, 1997). Auch andere A/B-Toxine, darunter das Cholera- und Diphtherie-Toxin, wurden bereits erfolgreich mit [¹²⁵I] markiert und deren intrazellulärer Transport *in vivo* analysiert (Dorland *et al.*, 1979; Janicot und Desbuquois, 1987). Ebenfalls gelang es auch Schnöder (2009) und Li *et al.* (2011) die intrazelluläre Expression verschiedener RTA-Varianten durch radioaktive Markierung ([³⁵S]) in Hefen nachzuweisen. Der biochemische Nachweis würde eine Vielzahl

neuer Möglichkeiten eröffnen. So könnte beispielsweise die zeitliche Internalisierung von RTA^{HDEL} mit der bereits von Wales *et al.* (1993) beschriebenen Internalisierung von RTA und RTA^{KDEL} verglichen werden. Des Weiteren könnte auch die Lokalisation der Toxinvarianten während unterschiedlicher Zeitpunkte mittels Zellfraktionierungsstudien näher analysiert werden. Zudem bestünde die Möglichkeit, die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren, wie z. B. Retro-2 oder Exo-2, auf den Transport der RTA-Varianten zu charakterisieren.

Herstellung fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten

Die grundlegende Voraussetzung für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der RTA-Endozytose und des intrazellulären Transports ist die Herstellung aktiver, fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten. Seit der Erfindung der Fluoreszenzmikroskopie zu Beginn des 20. Jahrhunderts hat sich die Technik stetig weiterentwickelt und ist zu einem wesentlichen Bestandteil der naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung geworden. Heute existieren unterschiedliche Verfahren, fluoreszenzmarkierte Proteine herzustellen. Dies kann beispielsweise durch kleine organische Fluorophore erfolgen, die entweder an Antikörper oder direkt an das Protein gekoppelt werden (Haugland, 1995). Mehrere Hundert solcher meist unter 1 kDa großen Farbstoffe sind derzeit kommerziell erhältlich. Aufgrund ihrer Variabilität hinsichtlich Helligkeit, Wellenlänge und Photostabilität sind sie für ein breites Anwendungsspektrum geeignet (Giepmans *et al.*, 2006). Viel *et al.* (2008) waren bereits in der Lage, die Bindung einer Fluorophor-gekoppelten B-Untereinheit des Shiga-Toxins an den Gb3-Rezeptor auf der Oberfläche von Tumorzellen zu detektieren. Zusätzlich konnte auch die Internalisierung des Shiga-Toxins durch die Markierung mit Fluorophoren in Säugerzellen verfolgt werden (Mallard *et al.*, 1998). Majoul *et al.* (1996) konnten zudem den retrograden Transport des Cholera-Toxins analysieren, in dem ein organisches Fluorophor an die B-Untereinheit gekoppelt wurde. Zwar ist die Markierung von RTA mit Fluorophoren realisierbar, jedoch könnten sich das zumeist reduzierende Milieu der Kopplungsreaktion und die zusätzlichen Arbeitsschritte negativ auf die biologische Aktivität von RTA auswirken.

Eine weitere, in den letzten Jahren zunehmend häufig angewandte Alternative stellt die Markierung mit Quantum dots (QD) dar. Diese anorganischen Nanokristalle sind meist aus einem Cadmium-Kern und einer Zinksulfid-Hülle aufgebaut und besitzen neben einem hohen Extinktionskoeffizienten vor allem eine gute Fluoreszenzquantenausbeute (Giepmans *et al.*, 2006). In früheren Studien wurden bereits verschiedene Toxine, wie z. B. das Shiga-Toxin oder auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ricin, mit QD markiert und deren

intrazellulärer Transport untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Markierung den natürlichen retrograden Transport der Toxine sowie die Physiologie der Zelle sehr stark beeinflusst, weshalb diese Art der Markierung ungeeignet für die Untersuchung des retrograden Transports von RTA ist (Sandvig *et al.*, 2010b; Tekle *et al.*, 2008).

Durch die Entdeckung von Fluoreszenzproteinen, wie z. B. GFP, konnte die Fluoreszenzmikroskopie revolutioniert werden, da damit die Markierung von Proteinen auf genetischer Ebene möglich wurde (Prasher, 1995; Prasher *et al.*, 1992). Bei GFP handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, welches erstmals 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura *et al.*, 1962). Anfangs wurden Fluoreszenzproteine hauptsächlich zur Untersuchung der Genexpression und Proteinlokalisierung verwendet (Chalfie *et al.*, 1994). Neuerdings werden Fluoreszenzproteine aber auch beim „live cell imaging“ eingesetzt, um den intrazellulären Transport von Toxinen oder die Proteindynamik bestimmter zellulärer Prozesse zu charakterisieren (Bjerling *et al.*, 2012; Giepmans *et al.*, 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen RTA-Varianten auf genetischer Ebene mit dem für Säugerzellen kodonoptimierten „enhanced GFP“ (eGFP) fusioniert. Bei dieser Variante konnte die Fluoreszenzintensität durch die Einführung zweier Mutationen verbessert werden (Yang *et al.*, 1996). Die Wahl für diese Markierungsmethode basiert auf der kofaktorunabhängigen Fluoreszenzbildung sowie der Möglichkeit, den Toxintransport an lebenden Zellen zu studieren (Giepmans *et al.*, 2006). Die Sequenz von GFP wurde an den N-Terminus der RTA-Sequenz fusioniert, um eine Maskierung der C-terminalen ER-Retentionssignale zu verhindern. In Hefen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die N- als auch C-terminale Fusion von GFP keine negativen Auswirkungen auf die Toxizität von RTA hat (Sander, 2008). Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Markierungsart war zudem die Tatsache, dass bereits in früheren Arbeiten eine RTA-Variante mit N-terminalem GFP erfolgreich in *E. coli* hergestellt werden konnte (Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Ebenso wurden auch andere Toxin-Untereinheiten, wie z. B. die schwere Kette des Botulinum-Toxins, der Ödem-Faktor und der Letal-Faktor des Anthrax-Toxins sowie das C-Fragment des Tetanus-Toxins mit Fluoreszenzproteinen fusioniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert. Dabei blieb die enzymatische Aktivität weitestgehend erhalten und auch das Trafficking innerhalb der Zielzelle schien nicht negativ beeinflusst zu sein (Ho *et al.*, 2011; Kissa *et al.*, 2002; Zornetta *et al.*, 2010).

Neben der bereits erfolgreich in *E. coli* exprimierten, eGFP-markierten RTA-Fusion konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals die fluoreszenzmarkierten Toxinfusionen eGFP-RTA_{His}^{KDEL} bzw. eGFP-RTA_{His}^{HDEL} in *E. coli* hergestellt werden. Sowohl nach der Detektion

mit spezifischen GFP- und RTA-Antikörpern als auch nach UV-Detektion waren die Toxinfusionen auf der erwarteten Höhe von ca. 57 kDa in den Zelllysaten zu erkennen. Des Weiteren konnten die einzelnen Toxinvarianten mittels Affinitätschromatographie in hoch reiner Form (90-95 %) aus den Lysaten isoliert werden. Ein Verlust der eGFP-Fluoreszenz konnte bei Reinigung und Umpufferung nicht verzeichnet werden. Um dennoch einen Verringerung der eGFP-Fluoreszenz während der Lagerung zu vermeiden, sollten die gereinigten Toxinvarianten in neutralen bis leicht basischen Puffern aufbewahrt werden. Es ist bekannt, dass die Fluoreszenz einer GFP-getaggen K28-Toxinfusion bereits bei einem pH von 5,5 um ca. 50 % reduziert wird (Gießelmann, 2011). Dies liegt wahrscheinlich an der pH-Sensitivität von GFP, die durch Protonierung des Chromophors und Konformationsänderungen bedingt wird (Patterson *et al.*, 1997; Shaner *et al.*, 2005; Tsien, 1998). Die beobachtete Verringerung der Expressionsraten (maximal 25 mg/l) verglichen zu den nicht-markierten Toxinvarianten (maximal 50 mg/l) ist einerseits auf die Reduzierung der Expressionstemperatur von 28°C auf 20°C zurückzuführen und andererseits durch die Größe der Toxinfusion bedingt. Dennoch sind die Proteinausbeuten vergleichbar mit den Resultaten früherer Arbeiten, bei denen ca. 30-40 mg/l eGFP-getaggtetes RTA aus *E. coli* mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte (Liu *et al.*, 2006). Zwar war auch die Expression der eGFP-RTA-Varianten bei 28°C möglich, jedoch zeigten die gereinigten Varianten keine *in vivo* Toxizität gegenüber HeLa-Zellen, womit deren biologische Aktivität ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt). Erst nach Verringerung der Expressionstemperatur auf 20°C konnte die biologische Aktivität von eGFP-RTA^{HDEL} und eGFP-RTA^{KDEL} belegt werden. Dies ist vermutlich auf eine verbesserte Faltung der Toxinfusionen in die biologisch aktive Konformation bei 20°C zurückzuführen. Die Behandlung mit eGFP-RTA führte wie bei den nicht-markierten Toxinvarianten zu keiner signifikanten Reduzierung der Zellvitalität. Der Befund steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen ebenfalls keine *in vivo* Toxizität von eGFP-RTA gegenüber HeLa-Zellen mittels enzymbasierten Toxizitätstests beobachtet werden konnte. Die Aufnahme und *in vivo* Toxizität von eGFP-RTA war erst durch Kopplung an spezielle Nanotubes, die eine effektive Toxinaufnahme ermöglichen, zu beobachten, womit zugleich eine fehlende biologische Aktivität der Toxinfusion ausgeschlossen werden kann (Wang *et al.*, 2010). Lui *et al.* (2006) beschrieben hingegen eine Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber eGFP-RTA. Kurioserweise waren die eingesetzten Toxindosen jedoch geringer als bei Wang *et al.* (2010). Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine toxische Wirkung von eGFP-RTA bei einer ca. 25-fach höheren Toxindosis festgestellt wurde, sind die von Lui *et*

al. erhaltenen Ergebnisse zu hinterfragen. Dennoch sollte in Zukunft geklärt werden, ob die fehlende *in vivo* Toxizität von eGFP-RTA auf die Sensitivität der enzymbasierten Nachweismethode zurückzuführen ist.

Außerdem wäre eine Optimierung der Lagerungsbedingungen notwendig, da sowohl die biologische Aktivität von nicht-fluoreszenzmarkierten als auch fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten nach sechs bis acht Wochen bei einer Lagerung im Kühlraum (4°C) verloren ging. Zusätzlich konnte eine Fragmentierung der fluoreszenzmarkierten Varianten nach längerer Lagerung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine vielversprechende Lagerungsmöglichkeit stellt die Lyophilisierung dar. Mit Hilfe dieser Technik konnte bereits eine mCherry-getaggte K28-Toxininfusion über einen unbegrenzten Zeitraum gelagert werden. Zudem hatte die Lagerung keine negativen Folgen auf die Toxizitäts- und Fluoreszenzeigenschaften der Fusion (Gießelmann, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten somit die Voraussetzungen zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Toxinaufnahme und des Toxintransports der verschiedenen RTA-Varianten an lebenden Säugerzellen geschaffen werden.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Koloalisation von RTA und Erd23

Die klassische indirekte Immunfluoreszenz wird generell zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von zellulären Strukturen und zur Lokalisation von Proteinen eingesetzt. Eine entscheidende Voraussetzung für die Detektion intrazellulärer Proteine stellt dabei die vorherige Fixierung und Permeabilisierung der Zellen dar. Bei diesen Behandlungsschritten kann es jedoch zur Autofluoreszenz sowie zu Artefakten kommen, wodurch die Interpretation der Resultate erschwert wird (Petty, 2007). Zudem ist diese Technik nicht zur Echtzeitanalyse der intrazellulären Transportprozesse von A/B-Toxinen an lebenden Zellen geeignet. Dennoch konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz entscheidende Erkenntnisse in Bezug auf die Internalisierung von A/B-Toxinen gewonnen werden. Dazu zählen unter anderem die Identifizierung von unterschiedlichen endosomalen Komponenten, die an der Translokation des *Pseudomonas* Exotoxin A beteiligt sind sowie die Rolle des Zytoskeletts an der Internalisierung des Cholera-Toxins (Alami *et al.*, 1998; Streuli *et al.*, 1981). Ebenso konnte die Beteiligung von Flotillin 1 und 2 am intrazellulären Transport von Shiga-Toxin sowie Ricin durch die Methode näher charakterisiert werden (Pust *et al.*, 2010). Die Immunfluoreszenzmethode lieferte zudem erste Indizien für den retrograden Transport des Shiga-Toxins von den endosomalen Kompartimenten zum TGN (Warnier *et al.*, 2006).

Um jedoch einen Einblick in die Dynamik von zellulären Prozessen in einzelnen Zellen, wie z. B. der Endozytose und den retrograden Transport von Toxinen, zu erhalten, ist die Untersuchung am lebenden Organismus unerlässlich. Mit Hilfe des „live cell imaging“ besteht die Möglichkeit, diese komplexen Abläufe in Echtzeit an lebenden Zellen zu verfolgen und zu beschreiben (Meijering *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2005). So konnte durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Shiga-Toxin-Untereinheiten in „live cell imaging“ Experimenten bestätigt werden, dass der Retromer-Komplex eine entscheidende Rolle beim retrograden Toxintransport vom Endosom zum Golgi-Apparat spielt (Bujny *et al.*, 2007; Popoff *et al.*, 2007). Auch die Endozytose und der intrazelluläre Transport von mit Quantum dots gelabeltem Ricin konnte unter Echtzeitbedingungen beobachtet werden (Tekle *et al.*, 2008). Zwar wurde das QD-markierte Ricin von den Zellen endozytiert, jedoch war der Endosom-Golgi-Transport stark beeinträchtigt, wodurch die Visualisierung des retrograden Transports von Ricin unter diesen Bedingungen nicht möglich war.

Um den retrograden Transport von RTA, RTA^{KDEL} und RTA^{HDEL} besser verstehen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit der intrazelluläre Toxintransport mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten RTA-Toxininfusionen in Echtzeit analysiert und neue Einblicke in deren Intoxifikationsmechanismen gewonnen werden. In früheren Untersuchungen konnten bislang nicht gezeigt werden, dass eGFP-markiertes RTA von HeLa-Zellen endozytiert wird (Wang *et al.*, 2010). Wie bereits bei der Western-Analyse konnte auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine intrazellulären Fluoreszenzsignale, die auf eine Aufnahme von eGFP-RTA hindeuten würden, beobachtet werden. Obwohl sich die Resultate mit den Beobachtungen von Wang *et al.* (2010) decken, kann aufgrund der Untersuchungen von Wales *et al.* (1993) davon ausgegangen werden, dass eine geringe Anzahl an Toxinmolekülen von den Zellen internalisiert wird. Da die Inhibierung der Proteinbiosynthese erst bei hohen RTA-Dosen erfolgt, scheint nur eine sehr geringe Toxinmenge endozytiert zu werden. Obwohl sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Wang *et al.* (2010) keine signifikante *in vivo* Toxizität von eGFP-RTA festgestellt werden konnte, ist eine fehlende biologische Aktivität der Toxinvariante jedoch eher unwahrscheinlich, da einerseits die N- bzw. C-terminale Fusion von yEGFP keinen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von RTA in Hefen hatte (Sander, 2008). Andererseits konnten Wang *et al.* (2010) zusätzlich belegen, dass ebenfalls in *E. coli* exprimiertes eGFP-RTA eine biologische Aktivität besitzt. Eine mögliche Ursache stellt die bereits angesprochene Tatsache dar, dass die Nachweismethode nicht sensitiv genug ist, um den schwachen toxischen Effekt der wenigen endozytierten RTA-Moleküle zu detektieren.

Vermutlich liegt auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die Menge an endozytiertem eGFP-RTA unter der GFP-Nachweisgrenze: In früheren Untersuchungen wurde diese mit ca. 10.000 Molekülen im Zytoplasma angegeben (Patterson *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen haben jedoch belegt, dass unter optimalen Bedingungen bereits die Detektion einzelner Moleküle möglich ist. So konnte beispielsweise die axonale Bewegung einzelner UNC-104 Motorproteine, welche mit GFP fusioniert wurden, im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* analysiert werden (Zhou *et al.*, 2001). Des Weiteren konnten die Kernporenkomplexe von *Ustilago maydis* mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, indem die 16 Kernporenuntereinheiten von Nup107 mit GFP fusioniert wurden (Schuster *et al.*, 2011). Um in Zukunft eventuell eine Toxininternalisierung von eGFP-RTA beobachten zu können, sollten die Bedingungen bezüglich Puffersystem, Toxinmenge und Inkubationszeit variiert und optimiert werden. Zusätzlich könnte versucht werden, die Endozytose von eGFP-RTA durch Zugabe von Calcium oder Glukose zu steigern. Durch eine ansteigende Calciumkonzentration kann beispielsweise die Größe von endozytotischen Vesikeln erhöht und die Membranfusion beschleunigt werden (MacDonald *et al.*, 2005). Auch bei den hefespezifischen Killertoxinen K28 und K1 scheint die Calciumkonzentration eine wichtige Rolle bei der *in vivo* Toxizität zu spielen (Heiligenstein *et al.*, 2006; Kelkel, 2009; Kurzweilova und Sigler, 1993).

Auch bei eGFP-RTA^{KDEL} konnten in den durchgeführten Experimenten keine intrazellulären Fluoreszenzsignale in den Zellen detektiert werden, obwohl die Toxinvariante eine toxische Wirkung gegen HeLa-Zellen vermittelte. Im Vergleich zu eGFP-RTA waren jedoch vermehrt GFP-Signale auf Ebene der Plasmamembran zu erkennen, was zumindest auf eine Anlagerung des Toxins hindeutet. Möglicherweise waren die Versuchsbedingungen im Fall von eGFP-RTA^{KDEL} nicht optimal, um eine effiziente Aufnahme der Toxinvariante zu gewährleisten, weshalb künftig ebenfalls eine Optimierung der Parameter erfolgen sollte.

Bei eGFP-RTA^{HDEL} konnte die Internalisierung der Toxinvariante bestätigt werden. Nach zwei- bzw. vierstündiger Behandlung mit eGFP-RTA^{HDEL} konnten intrazelluläre Signale in HeLa-Zellen detektiert werden. Durch die spezifische Färbung der Plasmamembran mittels Rhodamin-gelabeltem RCA konnte zudem belegt werden, dass es sich dabei zumindest teilweise um intrazelluläre Signale handelt, da die Fluoreszenzsignale von allen Seiten mit der Plasmamembran umgeben waren. Künftig könnten durch den Einsatz von Bromphenolblau die extrazellulären GFP-Signale gequentscht werden, wodurch eine noch bessere Unterscheidung von intrazellulären und extrazellulären Fluoreszenzsignalen möglich wäre (Harata *et al.*, 2006).

Des Weiteren zeigten viele Zellen sowohl nach Behandlung mit eGFP-RTA^{KDEL} als auch eGFP-RTA^{HDEL} eine clusterartige GFP-Verteilung auf Ebene der Plasmamembran. Dabei könnte es sich um spezifische, Rezeptor-tragende Regionen handeln, an den die Toxinvarianten binden. Ein ähnliches clusterartiges Verteilungsmuster konnte beispielsweise auch bei verschiedenen Plasmamembran-Rezeptoren, wie z. B. dem Glutamat-Rezeptor 1 sowie dem EGF-Rezeptor beschrieben werden (Kammermeier, 2006; Van Belzen *et al.*, 1988). Da diese Anlagerung bei unmodifiziertem eGFP-RTA nicht zu beobachten war, sind vermutlich die zusätzlichen ER-Retentionssignale bei eGFP-RTA^{KDEL/HDEL} die Ursache für die verstärkte Clusterbildung. In ersten „live cell imaging“ Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass mit eGFP-RTA^{HDEL} behandelte HeLa-Zellen nach 30 bis 60 min eine clusterartige Verteilung der fluoreszenzmarkierten Toxinmoleküle auf Ebene der Plasmamembran aufweisen. Auch die bereits in der vorliegenden Arbeit bestätigte Endozytose von eGFP-RTA^{HDEL} konnte in Echtzeitaufnahmen an HeLa-Zellen beobachtet werden (Domenik Rammo, unveröffentlichte Daten).

Bereits Wales *et al.* (1993) stellten aufgrund ihrer Resultate die Vermutung auf, dass die säugerspezifischen KDEL-Rezeptoren bei der gesteigerten *in vivo* Toxizität von RTA^{KDEL} eine Rolle spielen. Aus den damaligen Resultaten wurde gefolgert, dass die Interaktion mit dem KDEL-Rezeptor vermutlich erst intrazellulär erfolgt, da keine spezifische Bindung von RTA^{KDEL} an HeLa-Zellen detektiert werden konnte. Neueste Untersuchungen an Hefezellen belegen jedoch, dass der hefespezifische HDEL-Rezeptor Erd2p in geringer Kopienzahl auch mit der Plasmamembran von Hefezellen kolokalisiert (Dausend, 2011). Die natürliche Funktion des Rezeptors könnte dabei in der Rückführung von ER-residenten Proteinen liegen, die fälschlicherweise bis zur Zelloberfläche transportiert werden (Dausend, 2011; Gießelmann, 2011). Einige ER-Chaperone, wie z. B. BiP und GRP94, als auch Calretikulin konnten bereits an der Zelloberfläche von Säugerzellen nachgewiesen werden (Wiest *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999). Durch die Kolokalisation des HDEL-Rezeptors mit der Plasmamembran kann somit der Verlust ER-residenter Proteine verhindert bzw. minimiert werden. Ein weiteres Indiz hierfür liefert die Beobachtung, dass die externe Zugabe des HDEL-tragenden Chaperons Kar2p das Überleben einer KAR2-defizienten Hefezelle ermöglicht (Gießelmann, 2011). Auch das HDEL-tragende Killertoxin K28 bindet an den Erd2p-Rezeptor auf Ebene der Plasmamembran und wird anschließend über rezeptorvermittelte Endozytose von der Zielzelle aufgenommen (Gießelmann, 2011). Im Unterschied zur Hefe ist in Säugerzellen bislang noch keine Kolokalisation der KDEL-Rezeptoren mit der Plasmamembran beschrieben, wobei dies auch in Säugerzellen nicht

auszuschließen ist. Die Clusterbildung von eGFP-RTA^{HDEL} deutet darauf hin, dass möglicherweise auch in Säugerzellen eine geringe Anzahl des HDEL-Rezeptors Erd23 mit der Plasmamembran kolokalisiert.

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Kolokalisation der säugerspezifischen KDEL-Rezeptoren mit der Plasmamembran stellen Komplementationsstudien an Hefen dar. Alle drei KDEL-Rezeptoren sind in der Lage, den Verlust des essentiellen hefespezifischen HDEL-Rezeptors Erd2p zu kompensieren. Interessanterweise verhalten sich die so komplementierten Hefestämme wieder sensitiv gegenüber dem hefespezifischen A/B-Toxin K28, obwohl normalerweise ein Verlust von Erd2p einen resistenten Phänotyp gegenüber K28 hervorruft (Domenik Rammo, unveröffentlichte Daten). Da Erd2p den Sekundärrezeptor für K28 darstellt und die Interaktion mit K28 auf Ebene der Plasmamembran stattfindet (Dausend, 2011), liegt die Vermutung nahe, dass die wiederhergestellte K28-Toxizität auf einer Plasmamembranlokalisation der säugerspezifischen KDEL-Rezeptoren beruht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nach Anfügen eines HDEL-Retentionssignals ebenfalls eine gesteigerte *in vivo* Toxizität von RTA festgestellt werden. Die Kolokalisationsstudien lieferten zudem erste Indizien, dass der säugerspezifische HDEL-Rezeptor Erd23 wahrscheinlich am Transport von eGFP-RTA^{HDEL} beteiligt und Ursache für die erhöhte *in vivo* Toxizität ist. In Zellen, die einen mCherry-markierten Erd23-Rezeptor exprimieren, konnten nach Behandlung mit eGFP-RTA^{HDEL} einzelne intrazelluläre gelbliche Fluoreszenzsignale detektiert werden. Anhand der Intensitätsprofile konnte eindeutig belegt werden, dass es sich dabei um Überlagerungen der roten und grünen Fluoreszenzsignale handelte, was auf eine Interaktion zwischen Toxinkonstrukt und Erd23-Rezeptor hindeutet. Zusätzlich entsprach das Expressionsmuster des überexprimierten mCherry-getaggten Erd23-Rezeptors in etwa dem natürlichen Expressionmuster von Erd23, womit dessen Funktionalität vermutlich gewährleistet ist (Raykhel *et al.*, 2007). In Hefen konnte ebenfalls keine Beeinträchtigung der Funktionalität einer Erd2p-GFP-Fusion beobachtet werden (Dausend, 2011). Die bisherigen Fluoreszenzaufnahmen zeigen ausschließlich Toxin-Rezeptor-Kolokalisationen im zellkernnahen Golgi-ER-Bereich, in dem der Rezeptor vorwiegend lokalisiert ist und seine Hauptfunktion erfüllt. Ob die Interaktion bereits auf Ebene der Plasmamembran oder erst im Golgi-Apparat stattfindet, konnte im Rahmen der Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, wobei die Ergebnisse zumindest auf eine intrazelluläre Interaktion hindeuten.

Erste *in vivo* Experimente an HeLa-Zellen belegen zudem, dass die *in vivo* Toxizität von RTA^{HDEL} durch eine vorherige Behandlung mit mCherry^{HDEL} signifikant verringert wird,

wobei bei unmodifiziertem RTA keine Veränderung zu beobachten war (Domenik Rammo, unveröffentlichte Daten). Die Absättigung des HDEL-Rezeptors hat vermutlich einen verminderten Toxintransport zur Folge, was wiederum die Theorie stützt, dass die KDEL-Rezeptoren am Transport von RTA^{HDEL} beteiligt sind. Auch der retrograde Transport von *Pseudomonas* Exotoxin A, welcher KDEL-Rezeptor-abhängig verläuft, konnte durch die intrazelluläre Expression von Lysozym^{KDEL} verhindert werden (Bard *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu veränderte sich die *in vivo* Toxizität von RTA^{KDEL} nach extrazellulärer Zugabe großer Mengen des synthetischen Peptids YTSEKDEL nicht (Wales *et al.*, 1993). Auch bei K28 führte die externe Zugabe von HDEL-Peptiden zu keiner Verringerung der Toxinwirkung in Hefen, obwohl die Toxinaufnahme durch den HDEL-Rezeptor Erd2p vermittelt wird (Eisfeld, 2001; Gießelmann, 2011). Beide Resultate könnten darauf hindeuten, dass eine Zugabe von Peptiden nicht ausreicht, den Rezeptor effizient abzusättigen, wodurch auch kein Effekt auf die Toxinwirkung detektiert werden konnte. Um diese Theorie zu bestätigen, sollte zukünftig der Einfluss einer Kompetition mit mCherry^{KDEL} auf RTA^{KDEL} untersucht werden. Es ist denkbar, dass unter diesen Bedingungen ebenfalls bei RTA^{KDEL} eine verminderte Toxizität zu beobachten ist. Ebenso ist noch unklar, ob der Transport von RTA^{HDEL} primär durch Erd23 vermittelt wird, da auch die beiden anderen KDEL-Rezeptoren Erd21 und Erd22 in der Lage sind, HDEL-tragende Proteine zu erkennen. Um diese Fragestellung genauer zu adressieren, könnten einzelne oder mehrere KDEL-Rezeptoren in Säugerzellen gleichzeitig mittels spezifischer siRNA runterreguliert und deren Auswirkung auf die *in vivo* Toxizität von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} analysiert werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die Kolo-kalisation von fluoreszenzmarkiertem RTA^{HDEL} mit dem säugerspezifischen HDEL-Rezeptor Erd23 nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Western-Analyse konnte auch die Toxinaufnahme der HDEL-tragenden RTA-Toxinvariante bestätigt werden. Zusammen mit den ersten „live cell imaging“ Experimente von Domenik Rammo legen die gewonnenen Resultate den Grundstein für die künftige fluoreszenzmikroskopische Analyse des retrograden Transports von eGFP-RTA^{HDEL} in Echtzeit. Zudem scheint eGFP-RTA_{His}^{HDEL} als neues Modell-Cargo zur Analyse des Erd23-vermittelten retrograden Transportmechanismus in Säugerzellen geeignet zu sein. Trotz der gewonnenen Erkenntnisse und Einblicke in den Transport von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} sind viele Fragen noch unbeantwortet. Neben der Optimierung der Aufnahmebedingungen sollte der primäre Schwerpunkt weiterer Studien darin liegen, die Aufnahme und den intrazellulären Transport von fluoreszenzmarkiertem RTA^{HDEL} über einen Zeitraum von mehreren Stunden fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen und die Daten mit

den Resultaten von unmodifiziertem RTA zu vergleichen. Durch den zusätzlichen Einsatz von Markerproteinen für die entsprechenden am retrograden Transport beteiligten Kompartimente (Endosomen, Golgi-Apparat, ER) könnte der intrazelluläre Transport noch detaillierter analysiert werden. Darüber hinaus sollte die vermutete Interaktion zwischen RTA^{HDEL} und Erd23 durch Koimmunpräzipitations-Experimente biochemisch belegt werden, wobei dies wahrscheinlich nur unter Verwendung von radioaktiv markierten RTA-Varianten möglich sein wird. Zusätzlich sollte dem in der vorliegenden Arbeit postulierten Hinweis nachgegangen werden, dass auch in Säugerzellen eine geringe Kopienzahl des Erd23-Rezeptors in der Plasmamembran kolokalisiert. Ein möglicher Versuchsansatz könnte dabei die Markierung eines extrazellulären Bereichs des Erd23-Rezeptors mit einer α -Bungarotoxin-Bindestelle auf genetischer Ebene darstellen. Durch die spätere Zugabe eines fluoreszenzmarkierten, nicht-membrangängigen α -Bungarotoxins könnte die Lokalisation des Rezeptors auf Ebene der Plasmamembran eventuell gezeigt werden (Kumari *et al.*, 2008; Sekine-Aizawa und Haganir, 2004; Wilkins *et al.*, 2008).

Intrazelluläre RTA-Expression in Säugerzellen

Viele A/B-Toxine, wie z. B. Cholera-Toxin, Shiga-Toxin, *Pseudomonas* Exotoxin A und Ricin, werden nach der Internalisierung retrograd in das ER transportiert (Rapak *et al.*, 1997; Sandvig *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2001). Nach Erreichen des ER erfolgt die Retrotranslokation der katalytischen A-Untereinheit in das Zytosol. Bei Ricin wird dabei zunächst die Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Untereinheit mit Hilfe der Proteindisulfid-Isomerase (PDI) gespalten und RTA anschließend durch EDEM-1 erkannt und wahrscheinlich der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) zugeführt (Slominska-Wojewodzka *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2004). Die Vermutung, dass RTA mit Hilfe von ERAD in das Zytosol gelangt, basiert vorwiegend auf Untersuchungen in Hefe. Da auf natürlichem Wege weniger als 5 % der endozytierten Ricin-Moleküle das ER-Lumen erreichen, ist die Untersuchung der ER-Retrotranslokation anhand direkter biochemischer Nachweismethoden in Säugerzellen nur schwer durchführbar (Van Deurs *et al.*, 1988). In Hefen hingegen existiert bereits ein artifizielles Testsystem, welches die Analyse des finalen ER-Retrotranslokationsschritts von RTA im Detail ermöglicht (Simpson *et al.*, 1999). Li *et al.* (2011) konnten mit Hilfe des Modellsystems biochemisch belegen, dass in Hefen die Dislokation von RTA aus dem ER in das Zytosol durch die ERAD-Maschinerie vermittelt wird. Ebenso konnte auch die ER-Retrotranslokation der katalytischen Untereinheiten des Killertoxins K28, hier jedoch ERAD-unabhängig, mit einem analogen Testsystem in Hefen

näher charakterisiert werden (Heiligenstein *et al.*, 2006; Kelkel, 2009; Sendzik, 2006). Zwar deutet auch in Säugerzellen alles darauf hin, dass der Ricin-Transport durch ERAD vermittelt wird, jedoch basiert diese Annahme meist auf indirekten Nachweisen (Moreau *et al.*, 2011).

Aufbauend auf den Hefe-Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit die intrazelluläre Expression verschiedener RTA-Varianten in HeLa-Zellen näher untersucht. Dabei wurde einerseits analysiert, inwieweit sich die *in vivo* Toxizität von zytosolisch exprimiertem RTA bzw. RTA^{E177D} von Toxinvarianten mit zusätzlichem Präprolactin-Signalpeptid (PL_{SS}) unterscheidet. Andererseits sollte geklärt werden, ob auch die intrazelluläre Expression von PL_{SS}-RTA bzw. PL_{SS}-RTA^{E177D} dazu genutzt werden kann, die ER-Retrotranslokation von RTA in Säugerzellen zu beschreiben. Die Toxizitätsuntersuchungen belegen, dass die zytosolische Expression von RTA bzw. RTA^{E177D} nur eine schwache, nicht-signifikante Abnahme der Zellvitalität induziert, während bei der Expression von Toxinvarianten mit ER-Signalpeptid eine starke Abnahme der Zellvitalität zu erkennen war. Bei PL_{SS}-RTA konnte nur noch eine Zellvitalität von ca. 16 % detektiert werden, wobei die mutierte Toxinvariante PL_{SS}-RTA^{E177D} mit ca. 28 % eine höhere Zellvitalität aufwies. Die erhöhte Zellvitalität ist wahrscheinlich auf die 50-fach reduzierte Aktivität von RTA^{E177D} zurückzuführen, wodurch eine geringere *in vivo* Toxizität verursacht wird (Allen *et al.*, 2007). Die Resultate der PL_{SS}-Varianten stehen im Einklang mit den Untersuchungen in Hefen, bei denen eine toxische Wirkung von RTA nach dem Import in das ER festgestellt werden konnte (Li *et al.*, 2011a; Schnöder, 2009). Ebenso konnte auch in HEK293T-Zellen gezeigt werden, dass die intrazelluläre Expression von RTA, das zusätzlich mit einem N-terminalen ER-Signalpeptid der schweren murinen MHC-I Kette modifiziert war, eine *in vivo* Toxizität verursacht (Redmann *et al.*, 2011). Sowohl in den Hefe-Untersuchungen von Schnöder (2009) als auch in den Säuger-Untersuchungen von Redmann *et al.* (2011) konnte dennoch ein signifikanter toxischer Effekt von zytosolisch exprimiertem RTA beobachtet werden, was jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit an HeLa-Zellen nicht bestätigt werden konnte. Die Vermutung, dass eine fehlende RTA-Expression die mögliche Ursache dafür ist, kann jedoch aufgrund der Immunfluoreszenz-Experimente ausgeschlossen werden. Nach Transfektion der jeweiligen Expressionsplasmide konnte in allen Zellen mit Ausnahme der Negativkontrolle eine intrazelluläre RTA-Expression detektiert werden. Die verringerte *in vivo* Toxizität ist möglicherweise auf den Einsatz unterschiedlicher Expressionsvektoren zurückzuführen. Die Promotoren der einzelnen Expressionsvektoren sind unterschiedlich, was eventuell eine unterschiedliche RTA-Expression zur Folge hat. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die durch die Behandlung mit RTA und RTA^{KDEL} vermittelte Toxizität bei verschiedenen

Zelllinien stark variieren kann (Wales *et al.*, 1993). Möglicherweise besitzen die im Rahmen der Arbeit verwendeten HeLa-Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber RTA als HEK293T-Zellen. Nichtsdestotrotz belegen sowohl die Resultate der vorliegenden Arbeit, als auch die Untersuchungen von Redmann *et al.* (2011), dass der ER-Import von RTA eine gesteigerte *in vivo* Toxizität gegenüber Säugerzellen vermittelt. Vermutlich wird RTA im ER zusätzlich posttranslational modifiziert, was zu einer gesteigerten enzymatischen Aktivität von RTA führt. So besitzt RTA zwei potentielle Glykosylierungsstellen, die im ER-Lumen posttranslational glykosyliert werden können. In Hefen konnte bereits gezeigt werden, dass im ER mindestens eine potentielle Glykosylierungsstelle posttranslational modifiziert wird (Li *et al.*, 2011a). Neue Studien zeigen zudem, dass der Glykosylierungszustand von Ricin entscheidend für die spätere *in vivo* Toxizität ist (Sehgal *et al.*, 2011). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb die importierten RTA-Varianten eine stärkere *in vivo* Toxizität in HeLa-Zellen vermitteln. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass ER-luminale Chaperone, wie z. B. BiP, die korrekte Faltung von RTA in seine zytotoxisch aktivere Konformation unterstützen. Insgesamt deuten die Resultate der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die intrazelluläre Expression von PL_{SS}-RTA prinzipiell zur Analyse der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA in Säugerzellen geeignet ist. Zudem waren weiterführende Experimente zur Etablierung des intrazellulären Expressionssystems angedacht, die jedoch aufgrund eines im Verlauf der Untersuchungen veröffentlichten *in vivo* Säugertestsystems zur Analyse der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA nicht weiter fortgeführt wurden (Redmann *et al.*, 2011). Das Prinzip des Testsystems basiert dabei ebenfalls auf einer plasmidgesteuerten intrazellulären Expression einer mit ER-Signalpeptid versehenen RTA-Variante in Säugerzellen und dem radioaktiven Nachweis der ER-importierten RTA-Untereinheit. Mit der Methode konnten Redmann *et al.* (2011) bereits belegen, dass der Einfluss einzelner Proteine auf die ER-Retrotranslokation von RTA nach spezifischem siRNA-vermitteltem „Knockdown“ mit Hilfe des Testsystems untersucht werden kann. Somit unterscheidet sich das artifizielle Testsystem nicht wesentlich von dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit angestrebten Modell, weshalb die vorgesehene Etablierung keine weiteren Neuerungen mit sich gebracht hätten. Aus diesem Grund sollte künftig auf das Testsystem von Redmann *et al.* (2011) zurückgegriffen und die Beteiligung weiterer Kandidatenproteine an der ER-Retrotranslokation von RTA charakterisiert werden. Mit Hilfe des Testsystems sollte vorrangig die mögliche Rolle des Sec61-Translokons an der ER-Zytosol-Dislokation von RTA analysiert werden.

Beteiligung von Sec61 α an der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA

Die Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum stellt den ersten und entscheidenden Schritt bei der Biogenese der meisten extrazellulären und vieler organellspezifischer Proteine in eukaryotischen Zellen dar (Zimmermann *et al.*, 2010). Die neusynthetisierten Proteine können dabei entweder cotranslational oder posttranslational in das ER importiert werden, wobei der eingeschlagene Transportweg durch die jeweilige N-terminale Signalsequenz bestimmt wird (Brodsky, 1998; Zimmermann *et al.*, 2010). Diese meist aus 15 bis 30 Aminosäuren bestehende Sequenz besitzt neben einem positiv geladenen Aminoterminus, einen hydrophoben Kern sowie eine ungeladene carboxyterminale Region (Von Heijne, 1983; Von Heijne, 1985; Von Heijne, 1986). Während beim posttranslationalen Import die Proteine zunächst vollständig im Zytosol synthetisiert und anschließend importiert werden, gelangen sie beim cotranslationalen Transport bereits während der Synthese über einen SRP-abhängigen Mechanismus in das ER-Lumen (Brodsky, 1998; Schwartz, 2007). Sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen erfolgt der Import in das ER über das Sec61-Translokon (Römis, 1999; Zimmermann *et al.*, 2010). In Säugerzellen setzt sich der trimere Komplex aus den Transmembranproteinen Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ zusammen, wobei der aktive Sec61-Komplex vermutlich aus zwei bis vier solcher heterotrimeren Subkomplexe besteht (Beckmann *et al.*, 1997; Gorlich und Rapoport, 1993; Hartmann *et al.*, 1994; Menetret *et al.*, 2005). Neben dem Sec61-Komplex, der sich in Hefen aus den Komponenten Sec61p, Sbh1p („Sec sixty one beta homolog“) und Sss1p („Sec sixty one suppressor“) zusammensetzt, besitzen Hefen zusätzlich den Ssh1-Komplex (Esnault *et al.*, 1993; Zimmermann *et al.*, 2010). Der aus Ssh1p, Shb2p und Sss1p bestehende Komplex vermittelt ausschließlich den cotranslationalen ER-Import, während der Sec61-Komplex zusammen mit Sec71p und Sec72p ebenfalls für den posttranslationalen Transport verantwortlich ist (Finke *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2010).

Zudem scheint der Sec61-Komplex auch bei der ER-Zytosol-Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine sowie bakterieller A/B-Toxine eine wichtige Rolle zu spielen (Jarosch *et al.*, 2002; Pilon *et al.*, 1997; Römis, 1999). So konnte beispielsweise *in vitro* belegt werden, dass das Cholera-Toxin durch den Sec61-Komplex aus Mikrosomen exportiert wird (Schmitz *et al.*, 2000). Auch das *Pseudomonas* Exotoxin A disloziert vermutlich aus dem ER-Lumen über das Sec61-Translokon in das Zytosol von Säugerzellen (Moreau *et al.*, 2011). Des Weiteren wird der Sec61-Komplex auch mit der ER-Zytosol-Retrotranslokation weiterer A/B-Toxine, wie z. B. dem Shiga-Toxin und dem hefespezifischen Killertoxin K28 in Verbindung gebracht (Eisfeld *et al.*, 2000; Yu und Haslam, 2005).

Obwohl ein direkter Beweis bislang nicht erbracht wurde, deutet eine Reihe von Beobachtungen darauf hin, dass der Sec61-Komplex den Retrotranslokationskanal für Ricin darstellt. Wesche *et al.* (1999) waren in der Lage, einen Komplex aus RTA und Sec61 α mit Hilfe von Anti-Sec61-Antikörpern aus dem Zelllysat Toxin-behandelter Vero-Zellen zu präzipitieren. Zudem zeigen die temperatursensitiven Hefe-Mutanten Sec61-32 und Sec61-42, die beide einen Defekt im ER-Export besitzen, eine verminderte proteasomale Degradation von RTA^{E177D} (Simpson *et al.*, 1999).

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der Arbeit der Einfluss des Sec61 α -Knockdowns auf die *in vivo* Toxizität von RTA, RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} näher analysiert. Die Western-Analyse belegt, dass das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Sec61 α -Silencing zu einer signifikanten Reduzierung des Sec61 α -Proteingehalts auf durchschnittlich 14 % in HeLa-Zellen führte. Der Sec61 α -Proteingehalt von ctrl-siRNA behandelten Zellen unterschied sich hingegen nicht signifikant von unbehandelten Zellen. Die zusätzlich durchgeführten Vitalitätstests bestätigen zudem, dass sich der Verlust des essentiellen Proteins Sec61 α negativ auf das Überleben der Zellen auswirkt, was sich in einer um ca. 20 % verminderten Zellvitalität gegenüber den mit ctrl-siRNA behandelten Ansätzen widerspiegelte.

Der Einfluss des Sec61 α -Knockdowns auf die *in vivo* Toxizität von RTA_{His} konnte im Rahmen der Arbeit nicht untersucht werden, da die Toxinbehandlung keinen nachweisbaren Effekt auf die Zellvitalität und -zahl von HeLa-Zellen hatte. Wie bereits bei den XTT-basierten Vitalitätstests konnte auch bei den WST1-basierten Vitalitätstests keine Toxizität beobachtet werden, wodurch keine Aussage über die Beteiligung von Sec61 α an der Retrotranslokation von RTA_{His} getroffen werden kann.

Die Bestimmung der Zellvitalitäten nach Behandlung mit RTA^{KDEL} belegen hingegen, dass der Verlust von Sec61 α eine signifikante Erhöhung der Zellvitalität verursacht. So lag die Zellvitalität von mit Sec61 α -siRNA behandelten HeLa-Zellen in Anwesenheit von RTA^{KDEL} mit ca. 70 % etwa 16 % über der von unbehandelten (54 %) bzw. mit ctrl-siRNA behandelten Zellen (54 %). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass wahrscheinlich auch bei einem Sec61 α -Restproteingehalt von ca. 14 % noch einzelne Toxinmoleküle in das Zytosol retrotranslozieren, wäre eine Zellvitalität von 100 % nach Toxinbehandlung auch nicht zu erwarten gewesen. Insgesamt deutet das Resultat somit darauf hin, dass das Sec61-Translokon am Transport von RTA^{KDEL} in HeLa-Zellen eine Rolle spielt. Diese Vermutung wird zudem durch die Bestimmung der Zellzahl unterstützt, bei der ähnliche Resultate erzielt werden konnten. Nach Behandlung mit RTA^{KDEL} entsprach die relative Zellzahl nicht mit siRNA

behandelter Zellen mit ca. 56 % in etwa dem Ergebnis der Zellvitalitätsbestimmung, wobei auch die Zellzahl von ctrl-siRNA behandelten Zellen (47 %) sich nicht wesentlich davon unterschied. Der Knockdown von Sec61 α hingegen führte zu einem Anstieg der Zellzahl auf ca. 71 %, womit sich die Ergebnisse in etwa mit den Zellvitalitätsbestimmungen decken.

Auch bei RTA^{HDEL} konnte eine Verringerung der *in vivo* Toxizität in mit Sec61 α -siRNA behandelten Zellen beobachtet werden, während unbehandelte und mit ctrl-siRNA behandelte Ansätze sensibler gegenüber der Behandlung mit RTA^{HDEL} waren. Auch dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass auch bei RTA^{HDEL} das Sec61-Translokon in den Toxintransport involviert ist. Die Zunahme der Zellvitalität zwischen unbehandelten und mit Sec61 α -siRNA behandelten Zellen entsprach mit ca. 20 % in etwa den Ergebnissen von RTA^{KDEL}. Dennoch konnte insgesamt eine verminderte Abnahme der Zellvitalität nach Zugabe von RTA^{HDEL} verzeichnet werden. Bei den XTT-basierten Vitalitätstests konnte dieser Unterschied jedoch nicht festgestellt werden. Da es sich beim WST1-basierten Vitalitätstest laut Herstellerangaben um eine sensitivere Nachweismethode als bei dem XTT-basierten Vitalitätstest handelt, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass RTA^{KDEL} gegenüber HeLa-Zellen eine leicht höhere *in vivo* Toxizität (ca. 15 %) als RTA^{HDEL} vermittelt. Allerdings sprechen die Resultate der Zellzahlbestimmung gegen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Toxinvarianten. So entsprachen die Zellzahlen von unbehandelten (56 %) und mit ctrl-siRNA behandelten Zellen (61 %) nach Behandlung mit RTA^{HDEL} ungefähr dem Ergebnis von RTA^{KDEL}. Um einen eventuellen Unterschied in der Toxizität statistisch belegen zu können, müssten die Experimente wiederholt werden.

Dennoch bestätigen die Untersuchungen, dass die *in vivo* Toxizität von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} durch den Verlust von Sec61 α signifikant verringert wird. Sec61 α scheint somit eine entscheidende Funktion beim Transport beider Toxinvarianten zu übernehmen. Bei wildtypischem Ricin konnte hingegen kein Effekt auf die *in vivo* Toxizität nach Knockdown von Sec61 α beobachtet werden (Moreau *et al.*, 2011). Moreau *et al.* (2011) konnten auch nach dem Doppelknockdown von Sec61 α und Sec61 β keine Veränderung der Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber Ricin beobachten. Da in den Untersuchungen die Knockdown-Effizienz nicht mittels Western-Analyse verifiziert wurde (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. F. Bard), kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Resultat um ein falsch negatives Ergebnis handelt und Sec61 α ebenfalls eine Rolle bei der Intoxifikation von Ricin spielt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente sprechen zumindest bei RTA^{HDEL/KDEL} für eine Beteiligung von Sec61 α . Eine möglicher Grund für den fehlenden Effekt bei Moreau *et al.* (2011) könnte eine zu geringe Knockdown-Effizienz von

Sec61 α sein. Es ist bereits bekannt, dass erst unter einem Sec61 α -Restproteingehalt von 20 % ein sichtbarer phänotypischer Effekt auf den ER-Import von Proteinen zu beobachten ist (Nico Schäuble, persönliche Mitteilung). Unter der Annahme, dass das Sec61-Translokon die Retrotranslokation von RTA vermittelt, könnte theoretisch auch der Toxinexport erst unter einem Sec61 α -Proteingehalt von 20 % signifikant inhibiert sein. Da für die Inhibierung der Proteinbiosynthese bereits wenige RTA-Moleküle ausreichen, könnten bei einem höheren Sec61 α -Gehalt noch genügend Toxinmoleküle in das Zytosol dislozieren.

Obwohl die Ergebnisse ein weiteres Indiz für die Beteiligung des Sec61-Translokons an der Intoxifikation von Ricin darstellen, sind sie kein direkter Beweis, dass die Retrotranslokation von RTA über das Sec61-Translokon vermittelt wird. Anhand der Resultate ist ebenfalls denkbar, dass sich der Knockdown von Sec61 α indirekt auf den Transport von RTA auswirkt. Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass ein Silencing von Sec61 α den co- und posttranslationalen Import von Signalsequenz-tragenden Vorläuferproteinen in das ER inhibiert (Lang *et al.*, 2012). Möglicherweise verringert oder inhibiert die geringere Anzahl an Sec61-Kanälen den ER-Import bestimmter Proteine, die eine wichtige Rolle beim retrograden Endosom-Golgi- bzw. Golgi-ER-Transport von RTA spielen, wodurch die Konzentration der entsprechenden Proteine in den jeweiligen Zielkompartimenten verringert sein könnte. Ein ineffektiver retrograder Transport von RTA^{KDEL} bzw. RTA^{HDEL} könnte ebenfalls eine Verringerung der *in vivo* Toxizität zur Folge haben. Ebenso könnte auch die Zahl der säugerspezifischen KDEL-Rezeptoren im Golgi-Apparat beeinflusst sein, wodurch der Toxintransport zum ER eingeschränkt ist und weniger Toxinmoleküle aus dem ER in das Zytosol dislozieren. In weiterführenden Experimenten sollte zukünftig untersucht werden, ob Sec61 α direkt oder indirekt an der Retrotranslokation beider RTA-Varianten beteiligt ist.

Nachweis der Sensitivität von Hefesphäroplasten gegenüber RTA

Im Gegensatz zu Säugerzellen sind intakte Hefen gegen die externe Zugabe von Ricin immun (Lord *et al.*, 1994). Aufgrund einer fehlenden Galaktosyltransferase besitzt *S. cerevisiae* keine galaktosylierten Oberflächenstrukturen, die normalerweise für die Bindung von Ricin verantwortlich sind (Gemmill und Trimble, 1999). Um dennoch die *in vivo* Aufnahme und den retrograden Transport von RTA in Hefen analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein hefebasiertes *in vivo* Testsystem zu entwickeln. Die fehlende Bindung an die Hefezellwand sollte durch die Verwendung von Hefesphäroplasten, bei denen die Zellwand durch Zymolyase-Verdau entfernt wurde, umgangen werden. Die *in vivo* Toxizität der einzelnen RTA-Varianten gegenüber Hefesphäroplasten wurde

anschließend indirekt mit Hilfe spezieller Mikrotiterplatten, die eine Messung des gelösten Sauerstoffs in einer Probe über die Zeit gestatten, ermittelt (John *et al.*, 2003). Mit der Methode konnten bereits die Effekte verschiedener Antibiotika auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* charakterisiert und beschrieben werden (Hutter und John, 2004).

Die Resultate bestätigen, dass die Inkubation mit unterschiedlichen RTA-Varianten keinen toxischen Einfluss auf intakte Hefezellen hat. Bei den Sauerstoffmessungen konnte eine rapide Abnahme der Sauerstoffkonzentration sowohl in Toxin behandelten als auch unbehandelten Ansätzen festgestellt werden, was für ein Wachstum der Hefezellen spricht. Hefesphäroplasten zeigten hingegen nur in den Kontrollansätzen eine Verringerung des gelösten Sauerstoffs. In Anwesenheit der RTA-Varianten war keine Reduzierung des Sauerstoffgehalts erkennbar. Sowohl bei RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} als auch bei unmodifiziertem RTA war ein konstant hoher Sauerstoffgehalt bei hohen Toxindosen (100 µg/ml) zu beobachten, was indirekt auf ein fehlendes Zellwachstum hindeutet. Die im Vergleich zu intakten Hefezellen beobachtete Rechts-Verschiebung der Sauerstoffkinetik lässt sich wahrscheinlich durch ein geringeres Wachstum erklären, welches aufgrund der fehlenden Zellteilung von Hefesphäroplasten hervorgerufen wird.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die *in vivo* Toxizität aller extern applizierten RTA-Varianten gegenüber Hefesphäroplasten belegt werden. Des Weiteren konnte im Unterschied zu Untersuchungen am Säuger auch die biologische Aktivität von rekombinant in *E. coli* exprimiertem, unmodifiziertem RTA nachgewiesen werden. Da es sich bei der Nachweismethode nicht um ein enzymbasiertes System handelte, unterstützt das Ergebnis ebenfalls die Annahme, dass der fehlende Toxizitätsnachweis im Säuger durch die eingesetzte enzymbasierte Methode bedingt ist. Durch die zusätzliche Hitzeinaktivierung der Toxinvarianten konnte ebenfalls sichergestellt werden, dass es sich bei der beobachteten Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um einen toxinspezifischen Effekt handelt. Interessanterweise konnte in Hefen der im Säuger nachgewiesene Unterschied zwischen RTA^{HDEL/KDEL} und unmodifiziertem RTA nicht beobachtet werden. Unter limitierenden Toxinkonzentrationen (3 µg/ml) konnten allerdings signifikante Unterschiede zwischen den Toxinvarianten festgestellt werden. Interessanterweise war der gelöste Sauerstoffgehalt bei RTA^{HDEL} behandelten Hefesphäroplasten (79,8 %) nach 16 h signifikant höher als bei RTA^{KDEL} (50,5 %) und RTA (47,1 %). Bei hohen Toxindosen gelangen wahrscheinlich bei allen drei Toxinvarianten genügend Toxinmoleküle in das Zytosol der Zielzellen, um die hefeeigenen Ribosomen zu inaktivieren, wohingegen bei geringen Toxindosen nur ein verbesserter retrograder Transport der Toxinvariante eine ausreichende Hemmung der

Proteinbiosynthese bewirkt. Die Ergebnisse demonstrieren somit, dass das Anfügen eines hefespezifischen HDEL-Retentionssignals einen effizienteren retrograden Transport von RTA in Hefen vermittelt als das säugerspezifische KDEL-Retentionssignal. Dieses Resultat lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Hefezellen verglichen zu Säugerzellen nur einen einzelnen zellulären HDEL-Rezeptor (Erd2p) besitzen, welcher ausschließlich HDEL- bzw. DDEL-tragende Proteine im sekretorischen Transportweg der Hefe erkennen und binden kann (Semenza *et al.*, 1990; Semenza und Pelham, 1992). Die in Säugerzellen vorhandenen KDEL-Rezeptoren Erd21, Erd22 und Erd23 erkennen hingegen sowohl das KDEL- als auch das HDEL-Motiv, womit sich die gesteigerte *in vivo* Toxizität beider Toxinvarianten in Säugerzellen erklären lässt (Raykhel *et al.*, 2007).

Parallel zu den Sauerstoffmessungen konnten die Ergebnisse auch mit einem weiteren Testsystem reproduziert werden. Dieses basiert auf der Messung der Propidiumjodid (PI)-Fluoreszenzzunahme in Hefen nach Inkubation mit den entsprechenden Toxinvarianten. Die Einlagerung von PI in die DNA bzw. RNA erfolgt verstärkt in toten Zellen, weshalb die Messung indirekt ein Maß für die *in vivo* Toxizität der RTA-Varianten darstellt. Nur in Toxin behandelten Hefesphäroplasten konnte eine Steigerung der Fluoreszenzintensität detektiert werden, wobei intakte Zellen in Anwesenheit der einzelnen Toxinvarianten keine signifikante Erhöhung der Intensitäten zeigten. Beide Testsysteme bestätigen somit die vorhandene Toxizität der einzelnen Toxinvarianten auf Hefesphäroplasten.

Neben den wildtypischen Hefesphäroplasten wurden auch die Deletionsmutanten $\Delta end3$ - und $\Delta rpl12B$ analysiert, um die Aussagekraft des in der vorliegenden Arbeit entwickelten *in vivo* Testsystems zu überprüfen. Raths *et al.* (1993) konnten bereits zeigen, dass die rezeptorvermittelte Endozytose und „fluid-phase“ Endozytose nach Deletion von *END3* in Hefen blockiert sind, wobei andere Vesikel-vermittelte Prozesse normal ablaufen. Der resistente Phänotyp der Deletionsmutante impliziert, dass alle drei Toxinvarianten in Hefen durch Endozytose aufgenommen werden. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die die Beteiligung unterschiedlicher Endozytosemechanismen, darunter auch die „fluid phase“ Endozytose, an der Internalisierung von Ricin und RTA zeigen konnten (Llorente *et al.*, 1998; Sandvig und van Deurs, 1996; Simpson *et al.*, 1998).

Der ribosomalen Mutante $\Delta rpl12B$ fehlt hingegen ein Protein der großen ribosomalen 60S Untereinheit, wodurch die Depurinierung der hefeeigenen Ribosomen im Sarcin/Ricin-Loop verhindert wird (Chiou *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Schnöder, 2009). Die fehlende Sensitivität der $\Delta rpl12B$ -Zellen gegenüber den RTA-Varianten belegt zudem, dass die Inhibierung der hefeeigenen Ribosomen für die detektierte *in vivo* Toxizität verantwortlich ist. Schnöder

(2009) konnte ebenfalls nach intrazellulärer Expression von RTA kein vermindertes Wachstum in der $\Delta rpl12B$ -Deletionsmutante beobachten. Die beiden Deletionsmutanten zeigten die erwarteten Resultate und verdeutlichen, dass es sich um ein sehr sensitives Testsystem handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die externe Zugabe von RTA eine *in vivo* Toxizität in Hefesphäroplasten hervorruft. Das Anfügen eines hefespezifischen HDEL-Retentionssignals vermittelt dabei eine stärkere Toxizität in Hefen als das säugerspezifische KDEL-Motiv. Darüber hinaus stellt das neuartige Testsystem eine sehr sensitive und vielversprechende Methode zur Untersuchung von Aufnahme und retrogradem Toxintransport im Modellorganismus Hefe dar. Der große Vorteil eines hefebasierten gegenüber eines säugerbasierten Testsystems besteht hauptsächlich in der Verfügbarkeit einer kompletten Sammlung von Hefe-Deletionsmutanten. Dies eröffnet die Möglichkeit, ein umfassendes genetisches „Screening“ durchzuführen und die indirekte und direkte Beteiligung von Proteinen am retrograden Toxintransport zu testen. Die gewonnenen Daten könnten künftig dabei helfen, den effizienten und komplexen Intoxifikationsmechanismus von RTA und anderen bakteriellen, pflanzlichen oder viralen A/B-Toxinen besser zu verstehen. Des Weiteren könnten derartige „Screenings“ in Hefen dazu beitragen, neue Ziele und Therapiestrategien zu entdecken, um die Behandlung verschiedener Krankheiten wie z. B. Krebs zu verbessern.

Untersuchung zum retrograden Transport von RTA in Hefen

In der naturwissenschaftlichen Forschung werden häufig Reportersysteme eingesetzt, um molekulare Mechanismen, wie z. B. Genexpression, Signaltransduktion oder transkriptionelle Regulation, zu charakterisieren (Schenborn und Groskreutz, 1999). Zusätzlich bieten diese Reportersysteme die Möglichkeit, die *in vivo* Lokalisation von Proteinen sowie Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren (Cormack, 1998). Zu den prominentesten Reporterproteinen zählt neben dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP), die „firefly“-Luciferase sowie die β -Galaktosidase (Cormack, 1998). Mittlerweile werden Reportersysteme auch zunehmend zum indirekten Nachweis der *in vivo* Toxizität von bakteriellen und pflanzlichen Toxinen eingesetzt (Fairey und Ramsdell, 1999; Quinones *et al.*, 2009). Mit Hilfe eines Luciferase-basierten Reportertestsystems konnte bereits die Hemmung der Proteinbiosynthese am Beispiel von Shiga-, Diphtherie- sowie *Pseudomonas* Exotoxin A analysiert werden (Zhao und Haslam, 2005). Moreau *et al.* (2010) nutzten ebenfalls ein Luciferase-basiertes Testsystem, um die Ricin-vermittelte Inhibierung der Proteinbiosynthese

zu detektieren. Außerdem existiert in HeLa-Zellen ein GFP-Reportersystem, mit dessen Hilfe die *in vivo* Toxizität intrazellulär exprimierter RTA-Varianten untersucht werden kann (Redmann *et al.*, 2011). Schnöder (2009) war es ebenfalls gelungen, ein GFP-Reportersystem in *S. cerevisiae* zu etablieren, um den Einfluss unterschiedlicher Deletionsmutanten auf die ER-Zytosol-Retrotranslokation von intrazellulär exprimierten RTA-Varianten zu charakterisieren. Der Nachweis der *in vivo* Toxizität basiert sowohl bei den Luciferase- als auch bei den GFP-basierten Reportersystemen auf der indirekten Bestimmung der *in vivo* Expression des jeweiligen Reportergens. Der Vorteil von GFP besteht vorwiegend in der kofaktorunabhängigen Detektion der resultierenden Fluoreszenz durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren, während im Fall der Luciferase ein zusätzliches Substrat, Luciferin, zugesetzt werden muss. Das Substrat wird in Oxyluciferin umgesetzt, wobei die dabei entstehende Chemilumineszenz nachgewiesen wird (Fan und Wood, 2007).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die *in vivo* Toxizität von RTA gegenüber Hefesphäroplasten bestätigt werden konnte, wurde neben dem Respirationstestsystem zusätzlich ein *in vivo* GFP-Reportersystem im Modellorganismus *S. cerevisiae* etabliert. Das bereits bestehende intrazelluläre RTA-Testsystem von Schnöder (2009) wurde durch Verwendung von Hefesphäroplasten an die Untersuchung von extern appliziertem RTA angepasst. Durch die Inkubation der Hefesphäroplasten mit dem Inhibitor G418 konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Proteinbiosynthese zu einer verringerten GFP-Fluoreszenz führt. Da Ricin durch die Inaktivierung der Ribosomen ebenfalls die Proteinbiosynthese blockiert, sollte ein ähnlicher Effekt auch in Anwesenheit von RTA beobachtet werden. Anhand der Resultate konnte belegt werden, dass Hefesphäroplasten nach Behandlung mit 100 µg/ml RTA eine ca. 50 % verringerte GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Die Untersuchungen bestätigen somit, dass die Hemmung der Proteinbiosynthese indirekt durch die Messung der GFP-Fluoreszenz detektiert und das Testsystem zur Untersuchung der RTA-Intoxifikation in Hefen eingesetzt werden kann.

Auch die anschließende Validierung des Testsystems konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Bei den Deletionsmutanten $\Delta hrd1$ und $\Delta der1$ war wie erwartet eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz zu erkennen, womit deren Beteiligung am Transport von extern appliziertem RTA belegt werden konnte. Li *et al.* (2011) konnten ebenfalls bestätigen, dass die Ubiquitin-Ligase Hrd1p eine wichtige Rolle bei der ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA übernimmt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *DER1* einen resistenten Phänotyp in Hefen hervorruft (Li *et al.*, 2011a). Auch im Säuger konnte das entsprechende Homolog Derlin 1 als wichtiger Bestandteil des Ricin-Transports identifiziert

werden (Moreau *et al.*, 2011). Da beiden Proteinen eine wichtige Rolle beim hefeeigenen ERAD besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass auch extern appliziertes RTA nach Internalisierung retrograd zum ER transportiert, durch die ERAD-Maschinerie erkannt und in das Zytosol transloziert wird. Auch die Resultate der $\Delta yos9$ und $\Delta nup120$ Mutanten entsprechen den Erwartungen; beide Mutanten zeigten nach Toxinbehandlung eine ähnliche Fluoreszenz wie wildtypische Hefesphäroplasten. Der fehlende Einfluss von Yos9p am RTA-Transport konnte auch in Hefen beobachtet werden (Li *et al.*, 2011a). Auch im Säuger konnte bislang keine Beteiligung des Homologs OS-9 am Ricin-Transport festgestellt werden. Ebenso sind auch nukleärer Proteine nicht in die Intoxifikation von Ricin involviert, wodurch sich der fehlende Effekt von $\Delta nup120$ auf den RTA-Transport erklären lässt. Um lediglich Deletionsmutanten mit einem starken Einfluss auf den intrazellulären RTA-Transport zu identifizieren, wurde ein Signifikanz-Schwellenwert definiert. Dieser wurde auf 75 % gesetzt, da die Fluoreszenzwerte der Positivkontrollen $\Delta hrd1$ und $\Delta der1$ bei ca. 80 % bis 85 % lagen. Damit wurden einerseits die Standardabweichungen von maximal 10 % berücksichtigt und andererseits liegt der Schwellenwert ca. 25 % über der durchschnittlichen Fluoreszenz von Toxin-behandelten, wildtypischen Hefen, wodurch falsch positive Resultate verhindert werden.

Insgesamt stellt das entwickelte GFP-Reportersystem eine sehr sensitive und einfache Methode dar, um den retrograden Transport von extern appliziertem RTA vom Endosom über den Golgi-Apparat zum ER im Modellorganismus *S. cerevisiae* zu untersuchen. Zusätzlich zeigten die Untersuchungen, dass die Methode eine hohe Reproduzierbarkeit mit einer geringen Standardabweichung der Messwerte (1 % bis 10 %) vereint. Im Rahmen der Arbeit konnte ebenfalls belegt werden, dass das GFP-Reportersystem auch zur Untersuchung des retrograden Transports der Killertoxine K1 und K28 geeignet ist. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten wildtypische Hefesphäroplasten nach Behandlung mit den Killertoxinen ebenfalls eine verminderte Fluoreszenz. Im Gegensatz zu RTA wird dieser Effekt nicht durch die Inaktivierung der Ribosomen, sondern durch die Toxin-vermittelte Abtötung der Hefezellen hervorgerufen, wodurch die GFP-Expression verhindert wird. Neben RTA kann zukünftig auch der retrograde Transport von anderen Proteinbiosynthese inaktivierenden Toxinen, wie z. B. Zymocin, mit Hilfe des Testsystems untersucht werden (Jablonowski *et al.*, 2001; Jablonowski und Schaffrath, 2007).

Ein weiterer entscheidender Vorteil des hefebasierten Testsystems ist die Verfügbarkeit einer kompletten Sammlung an Deletionsmutanten, wodurch der Einfluss der einzelnen Deletionsmutanten auf den RTA-Transport direkt untersucht werden kann. Im Säuger

hingegen ist die Herstellung von stabilen Knockout-Zelllinien sehr zeitaufwendig, weshalb für die meisten Proteine keine entsprechenden Varianten vorhanden sind. Um dennoch den Einfluss bestimmter Proteine auf die Intoxifikation von Ricin zu untersuchen, wird im Säuger häufig die siRNA-Technologie eingesetzt. In *Drosophila melanogaster* wurde bereits ein RNAi-basiertes Testsystem etabliert, um die Beteiligung verschiedener Proteine an der Ricin-Intoxifikation zu testen (Pawar *et al.*, 2011). Auch Moreau *et al.* (2011) nutzten die siRNA-Methode, um in einem genomweiten „Screening“ die am Transport verschiedener A/B-Toxine, darunter *Pseudomonas* Exotoxin A, Diphtherie-Toxin und Ricin, beteiligten Proteine zu identifizieren. Da Ricin jedoch ein hoch potentes A/B-Toxin darstellt und eine geringe Anzahl an Toxinmolekülen ausreicht, um die Proteinbiosynthese zu inaktivieren, hat das Hefetestsystem einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber Säugersystemen (Eiklid *et al.*, 1980). Eine Deletion eines Hefegens hat einen kompletten Verlust des Zielproteins zur Folge, wohingegen der siRNA-Knockdown im Allgemeinen nur zur Verringerung des Proteingehalts führt. Der Restproteingehalt könnte dabei jedoch ausreichen, um den Transport einzelner Toxinmoleküle zum Zielkompartiment zu gewährleisten. Dadurch könnten mögliche Beteiligungen von Proteinen in Säugerexperimenten übersehen werden. Bei den Untersuchungen von Moreau *et al.* (2011) hatte der Knockdown der Sec61-Komponenten beispielsweise keinen Effekt auf den Ricin-Transport, während sowohl die Resultate der vorliegenden Arbeit als auch die *in vivo* Interaktion zwischen RTA und Sec61 α auf eine mögliche Beteiligung des Komplexes am Toxintransport hindeuten (Wesche *et al.*, 1999). Da in den Untersuchungen von Moreau *et al.* (2011) jedoch nicht die Knockdown-Effizienz mit Hilfe von Western-Analysen ermittelt wurde, besteht die Möglichkeit, dass ein ineffizienter Knockdown für die fehlende Beteiligung des Sec61-Komplexes verantwortlich ist (Prof. Dr. F. Bard, persönliche Mitteilung). Ein phänotypischer Effekt kann bei Sec61 α erst unter einem Restproteingehalt von 20 % beobachtet werden, was die Vermutung unterstützt, dass einzelne am Transport von Ricin beteiligte Proteine mit Hilfe des Säugertestsystems übersehen werden können (Nico Schäuble, persönliche Mitteilung).

Das etablierte *in vivo* Testsystem beschränkt sich momentan noch auf die Analyse nicht-essentieller Hefe-Deletionsmutanten, wobei künftig auch die Untersuchung essentieller Proteine durch deren Überexpression möglich sein sollte. In diesem Fall würde eine Zunahme der *in vivo* Toxizität, die gleichbedeutend mit einer Abnahme der GFP-Fluoreszenz verglichen zum Wildtyp ist, auf eine Beteiligung des Proteins am RTA-Transport hindeuten.

Mutantenanalyse zur Charakterisierung des RTA-Transports

Mit Hilfe des Testsystems konnten in der Analyse ausgewählter Mutanten mit Defekten im retrograden Transport erstmals mehrere Proteine identifiziert werden, die bei der Intoxifikation von RTA in Hefen eine wichtige Rolle übernehmen. Dabei wurde erstmals die Beteiligung der GTPase Ypt6p und deren Regulator Rgp1p am Transport von RTA bestätigt. Die Zunahme der GFP-Fluoreszenz sowohl bei $\Delta ypt6$ als auch $\Delta rgp1$ deuten auf einen vollständigen Verlust der RTA-Toxizität hin. Ypt6p besitzt dabei starke Ähnlichkeiten zu der humanen GTPase Rab6, welche mit dem Transport von Ricin in Verbindung gebracht wird. Utskarpen *et al.* (2006) und Moreau *et al.* (2011) konnten zeigen, dass der Knockdown von Rab6A einen verringerten Ricin-Transport vom Endosom zum Golgi-Apparat zur Folge hat. Da Ypt6p sowohl für die Rekrutierung von „tethering“-Faktoren als auch für die GTP-abhängige Fusion der Transportvesikel mit dem TGN zuständig ist, scheint die GTPase den Endosom-Golgi-Transport von RTA in der Hefe zu regulieren (Li und Warner, 1996; Luo und Gallwitz, 2003). Die wichtige Rolle von Ypt6p am RTA-Trafficking wird ebenfalls durch den starken Effekt der Deletionsmutante $\Delta rgp1$ unterstützt. Die beiden peripheren Membranproteine Rgp1p und Ric1p bilden in der Hefe einen aktiven Komplex, der an Ypt6p bindet und den Nukleotidaustausch an der GTPase reguliert (Siniosoglou *et al.*, 2000). Durch den Nukleotidaustausch wird Ypt6p aktiviert, wodurch die Fusion von endosomalen Transportvesikeln mit dem TGN erfolgen kann (Siniosoglou *et al.*, 2000). Zukünftig wäre jedoch noch zu klären, ob auch nach $\Delta ric1$ Deletion ein Verlust der RTA-Toxizität auftritt. Auch bei anderen A/B-Toxinen, wie z. B. dem Shiga-Toxin, wird der retrograde Transport durch das säugerspezifische Ypt6p-Ortholog Rab6A2 reguliert (Mallard *et al.*, 2002). Dennoch ist vorstellbar, dass die Deletion von *YPT6* ebenfalls eine Funktion beim Golgi-ER-Transport von RTA haben könnte. Luo *et al.* (2003) konnten beobachten, dass Ypt6p-Deletionsmutanten einen Defekt im Recycling von Sec22p aufweisen. Bei Sec22p handelt es sich um ein r-SNARE, das sowohl beim anterograden als auch beim retrograden Transport zwischen Golgi und ER eine Rolle spielt (Burri *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine starke Reduzierung der RTA-Toxizität in der Deletionsmutante $\Delta sec22$ beobachtet werden, was auf eine Beteiligung von Sec22p hindeutet. Auch die Untersuchungen von Moreau *et al.* (2011) konnten belegen, dass ein siRNA-vermittelter Knockdown des Säuger-Homologs Sec22B eine verminderte Sensitivität von HeLa-Zellen gegen Ricin zur Folge hat. Möglicherweise spielt Ypt6p sowohl beim Endosom-Golgi als auch Golgi-ER-Transport von RTA eine Rolle, was jedoch anhand der Resultate nicht näher eingegrenzt werden kann. Um ein besseres Verständnis über die Beteiligung von

Sec22p am RTA-Transport zu erhalten, sollten weitere Komponenten des anterograden (Sed5p, Bos1p und Bet1p) und retrograden Transportkomplexes (Sec20p und Ufe1p) von Sec22p analysiert werden (Burri *et al.*, 2003; Liu und Barlowe, 2002).

Des Weiteren bestätigen die Resultate, dass die Komponenten Vps51p und Vps54p eine wichtige Rolle beim Toxintransport in Hefen spielen. Die Deletion von *VPS52* hatte hingegen keinen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von RTA. In Hefen bilden beide Proteine zusammen mit Vps52p und Vps53p den GARP-Komplex, wohingegen bei Säugern bislang kein Vps51p-Homolog beschrieben ist (Bonifacino und Rojas, 2006; Conibear und Stevens, 2000; Fridmann-Sirkis *et al.*, 2006). Der Komplex fungiert als „tethering-Faktor“, der das initiale Andocken von Vesikeln an das TGN vermittelt (Bonifacino und Hierro, 2010). Es ist bekannt, dass zur Stabilität des GARP-Komplexes alle vier Komponenten notwendig sind und bereits das Fehlen einer einzelnen Komponente zu Defekten in der Sortierung und Lokalisation von Transportproteinen führt (Conibear und Stevens, 2000). Daher sollten alle drei Komponenten einen Effekt auf RTA haben. Wider Erwarten konnten Moreau *et al.* (2011) ähnliche Resultate bei der Analyse des Ricin-Transports im Säuger beobachten. Der Knockdown von Vps54 und Vps53 hatte einen starken Einfluss auf die Ricin-Toxizität, wohingegen bei Vps52 ebenfalls kein Effekt zu erkennen war. Die Annahme, dass es sich dabei um ein falsch negatives Resultat handelt, kann somit eher ausgeschlossen werden. Vielmehr deuten die beiden unabhängigen Ergebnisse in Säuger- und Hefezellen darauf hin, dass das postulierte Modell des GARP-Komplexes im Fall von RTA nicht zutrifft. Möglicherweise ist der GARP-Komplex auch ohne die Anwesenheit von Vps52p in der Lage, die Vesikelfusion zu initiieren und den Transport von RTA zu gewährleisten. Insgesamt decken sich die Resultate von Ypt6p und des GARP-Komplexes mit den Ricin-Ergebnissen im Säuger.

Außerdem zeigte die Mutantenanalyse eine weitere Gemeinsamkeit zwischen dem Transport von RTA und Ricin. Das Hefe-Homolog von Syntaxin 5, Sft2p, wird ebenfalls für den effizienten Transport von RTA in Hefen benötigt; die beobachtete Zunahme der GFP-Fluoreszenz bei $\Delta sft2$ Deletionsmutanten über den Schwellenwert deutet hierauf hin. Sft2p stellt ein nicht-essentielles Membranprotein dar, welches mit der Golgi-Membran kolokalisiert und vermutlich zur Vesikelfusion benötigt wird (Conchon *et al.*, 1999). Auch im Säuger schützt der Inhibitor Retro-2 Mäuse vor einer letalen Ricin-Dosis. Der Inhibitor blockiert dabei die Fusion von Syntaxin 5-positiven Vesikeln mit dem TGN und verhindert den Endosom-Golgi-Transport von Ricin, wobei der genaue Mechanismus noch unverstanden ist (Stechmann *et al.*, 2010). Auch beim Shiga-Toxin sowie beim Subtilase (SubAB) Zytotoxin ist Syntaxin 5 am retrograden Transport vom Endosom zum Golgi beteiligt

(Amessou *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2004). Beim Killertoxin K28 konnte hingegen kein Einfluss von $\Delta sft2$ auf die *in vivo* Toxizität beobachtet werden (Nina Müller, persönliche Mitteilung). K28 wird möglicherweise aufgrund des HDEL-Retentionssignals, welches RTA und dem Shiga-Toxin fehlt, über einen Sft2p-unabhängigen Mechanismus in den Golgi-Apparat transportiert. Zukünftig wäre es daher interessant zu untersuchen, ob die Deletion von *SFT2* auch beim Transport von RTA^{HDEL} bzw. RTA^{KDEL} keine Rolle spielt. Der fehlende protektive Effekt von Retro-2 auf die *in vivo* Toxizität von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} gegenüber HeLa-Zellen ist zumindest ein erster Hinweis, dass sich der retrograde Transport der modifizierten Toxinvarianten vom Ricin-Transport unterscheidet (Domenik Rammo, unveröffentlichte Daten). In Hefen scheint RTA wie auch im Säuger über eine ähnliche Transportroute zum TGN zu gelangen, was auch der fehlende Einfluss des Retromer-Komplexes untermauert. Dieser Komplex übernimmt eine wichtige Rolle bei der Formation von Vesikeln am Endosom, die für den retrograden Transport zum TGN bestimmt sind (Johannes und Popoff, 2008). Moreau *et al.* (2011) konnten belegen, dass das Retromer nicht in die Intoxifikation von Ricin involviert ist. Die Deletion aller Retromer-Komponenten zeigte keinen Effekt auf die RTA-Toxizität in Hefen, da keine signifikante Zunahme der GFP-Fluoreszenz zu beobachten war. Im Gegensatz zu Ricin benötigt das Shiga-Toxin den Retromer-Komplex zum Transport von den frühen Endosomen zu den Recycling-Endosomen (Lieu und Gleeson, 2010; McKenzie *et al.*, 2012).

Auch die beiden Sorting-Nexine Snx4p und Snx41p sind nicht in den RTA-Transport in Hefen involviert. In Säugerzellen wurde jedoch zumindest das Säuger-Homolog von Snx4p, SNX4, bereits indirekt mit dem Ricin-Transport in Verbindung gebracht (Skanland *et al.*, 2009), wobei in Hefen die Vesikel-Sortierung durch Snx4p keine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Neben Snx4p konnte auch ein Unterschied bei Tlg2p beobachtet werden. So konnte der in der Literatur beschriebene Einfluss des Säuger-Homologs von Tlg2p, Syntaxin 16, nicht eindeutig bestätigt werden (Amessou *et al.*, 2007; Moreau *et al.*, 2011). Zwar zeigte der Verlust von Tlg2p eine Zunahme der Fluoreszenz um ca. 16 %, jedoch wurde der Schwellenwert nicht überschritten. Da der 75 %-Schwellenwert willkürlich definiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Tlg2p zumindest teilweise am RTA-Transport beteiligt ist. Zusätzlich ist bekannt, dass das t-SNARE Tlg2p zusammen mit den t-SNAREs Tlg1p und Vti1p einen Komplex bildet, der die Fusion der Vesikel mit dem TGN vermittelt (Coe *et al.*, 1999). Eventuell spielt das essentielle Tlg1p eine übergeordnete Funktion beim Transport von RTA im Vergleich zu Tlg2p. Ein Hinweis dafür ist der starke Effekt von Vps51p, das normalerweise mit Tlg1p interagiert und somit die Bindung des GARP-

Komplexes gewährleistet (Fridmann-Sirkis *et al.*, 2006; Reggiori *et al.*, 2003). Da es sich bei Vti1p und Tlg1p um essentielle Proteine handelt, konnte der Einfluss nicht weiter analysiert werden. Zukünftig sollte durch Überexpressionsstudien beider Proteine deren Beteiligung am RTA-Transport geklärt werden.

Die vorliegenden Resultate deuten zudem darauf hin, dass der Transport von RTA nicht über COPIB-Vesikel vermittelt wird. Sowohl $\Delta sec28$ als auch $\Delta gcs1$ hatten keinen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von RTA. Neben dem retrograden Golgi-ER-Transport reguliert Gcs1p auch den COPIB-vermittelten Transport vom Endosom zum Golgi-Apparat (Robinson *et al.*, 2006). Sec28p hingegen gehört zum Coatomer Subkomplex B, der in Hefen zusätzlich Sec33p und Sec26p enthält (Eugster *et al.*, 2000). Das Protein stabilisiert Sec33p, wodurch COPIB-Vesikel intakt bleiben (Duden *et al.*, 1998). Auch im Säuger ist bislang keine Beteiligung von COPIB-Vesikeln am Ricin-Transport beschrieben.

Interessanterweise konnte auch die Beteiligung des v-SNAREs Snc1p bestätigt werden. Normalerweise spielt Snc1p zusammen mit Tlg2p eine wichtige Rolle beim Transport von sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran (Protopopov *et al.*, 1993). Zusätzlich hat es eine wichtige Funktion beim retrograden Transport von den frühen Endosomen zum TGN (Lewis *et al.*, 2000). Mittlerweile wird Snc1p auch mit der Endozytose in Verbindung gebracht (Gurunathan *et al.*, 2000). Eventuell spielt es auch bei der Endozytose von RTA in Hefen eine entscheidende Rolle. Der schwache Einfluss von Tlg2p und der fehlende Effekt von Snx4p und Snx41p sprechen gegen eine wichtige Rolle von Snc1p im Endosom-Golgi-Transport von RTA. Da beide Sorting-Nexine entscheidend für den Rücktransport von Snc1p vom Endosom zum Golgi sind, hätte deren Verlust einen starken Effekt auf die RTA-Toxizität haben müssen (Hettema *et al.*, 2003). Neben Snc1p existiert noch ein weiteres v-SNARE, Snc2p, dessen Beteiligung zukünftig näher analysiert werden sollte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Snc2p in den RTA-Vesikeln vorhanden ist und den Andockschrift mit den in der Golgi-Membran befindlichen t-SNAREs, wie z. B. Tlg1p oder Vti1p, vermittelt. Ebenso untermauert der starke Einfluss von $\Delta sso1$ die Theorie, dass Snc1p in die RTA-Endozytose involviert sein könnte. Es ist bekannt, dass Snc1p das Andocken und die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran vermittelt, in dem es zusammen mit den t-SNAREs Sso1p, Sso2p und Sec9p einen funktionalen SNARE-Komplex bildet (Aalto *et al.*, 1993; Gurunathan *et al.*, 2000). Bei Hefezellen, denen Sso1p fehlt, sollte die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran unterbunden sein, wodurch aufgrund des fehlenden Snc1p die effiziente Endozytose von RTA verhindert wird. Abschließend unterstützt auch der starke Einfluss von $\Delta syn8$ die Beteiligung von Snc1p an der

Toxininternalisierung. Syn8p kann zusammen mit Snc1p einen Komplex bilden, der in Hefen vermutlich eine Rolle beim Plasmamembran-Endosom-Transport spielt (Lewis und Pelham, 2002). Fehlt diese Interaktion aufgrund der Deletion, wird eventuell der Toxintransport zum frühen Endosom verhindert. Zukünftig sollte daher die *in vivo* Toxizität von RTA in den Deletionsmutanten $\Delta sec9$ und $\Delta sso2$ analysiert werden, um diese Annahme weiter zu untermauern. Ein mögliches Modell der RTA-Endozytose ist in Abbildung 58 dargestellt, wobei die jeweilige Funktion der drei Proteine beim Toxintransport noch unklar ist.

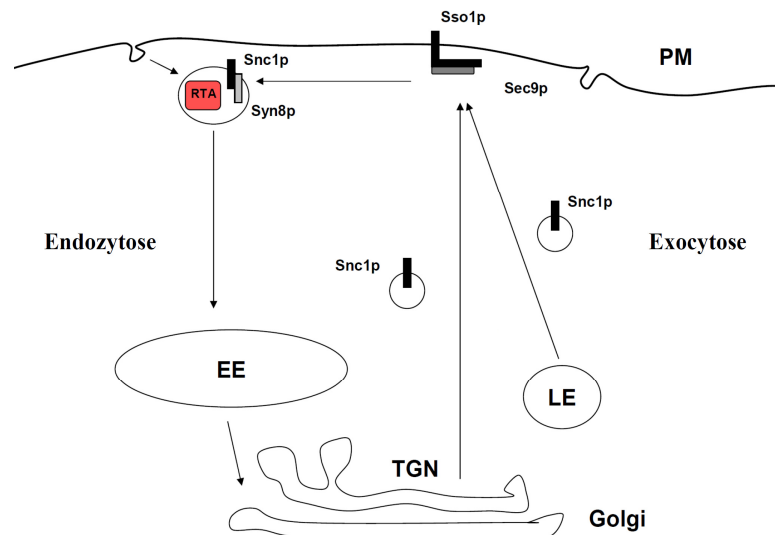


Abbildung 58: Modell des RTA-Transports von der Plasmamembran zum frühen Endosom in Hefen. (EE = Frühe Endosomen, LE = Späte Endosomen, PM = Plasmamembran)

Neben dem Endosom-Golgi-Transport wurden auch Mutanten mit Defekten im Golgi-ER-Transport untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl $\Delta glo3$ als auch $\Delta gea1$ einen starken Einfluss auf die RTA-Toxizität haben, was auf eine wichtige Funktion beider Proteine beim Toxintransport in Hefen hindeutet. Da beide Proteine Regulatoren der Arf-GTPasen darstellen, liegt die Vermutung nahe, dass die Arf-GTPasen in den retrograden Transport von RTA involviert sind (Lewis *et al.*, 2004; Peyroche *et al.*, 1996; Spang *et al.*, 2001). In Hefen werden sowohl Gea1p, Glo3p als auch die Arf-GTPasen mit dem Golgi-ER-Transport über COPI-Vesikel in Verbindung gebracht, weshalb vermutlich auch beim Transport die COPI-Vesikel eine Rolle spielen (Gaynor *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2004; Poon *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2007). Im Säuger hingegen scheint der Transport von Ricin COPI-unabhängig zu verlaufen, wobei auch ein COPI-abhängiger Transport nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann (Chen *et al.*, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass wohl auch in Hefen alternative RTA-Transportwege existieren. So konnte beispielsweise belegt werden, dass die

Deletion von *RER1* einen starken Einfluss auf das RTA-Trafficking hat. Bei Rer1p handelt es sich um ein Membranprotein, welches in der Golgi-Membran lokalisiert ist und als Rückhalterezepthor für Membranproteine aus dem ER fungiert (Nishikawa und Nakano, 1993; Sato *et al.*, 2001). Dieses Protein stellt einen vielversprechenden Kandidaten dar, um dessen Beteiligung am RTA-Transport in Hefen genauer zu analysieren. Ebenfalls ist nichts über den Einfluss des gleichnamigen Säuger-Homologs, Rer1, beim Transport von Ricin bekannt. Wie genau der Rezeptor in den RTA-Transport involviert ist, sollte durch künftige Studien geklärt werden. Ebenso zeigte die Deletionsmutante $\Delta sec22$ eine verminderte RTA-Toxizität. Bereits Moreau *et al.* (2011) konnten zeigen, dass das Säuger-Homolog von Sec22p, Sec22B, einen starken Einfluss auf die Ricin-Toxizität besitzt. Auch die Deletion von Erv46p bestätigt wiederum die große Gemeinsamkeit zwischen dem retrograden Transport von RTA und Ricin. Die Deletion von *ERV46* verursachte eine starke Verringerung der RTA-Toxizität gegenüber Hefesphäroplasten. In Hefen bildet Erv46p einen aktiven Komplex mit Erv41p, der zwischen ER und Golgi zirkuliert und in COPII-Vesikeln lokalisiert ist (Otte und Barlowe, 2002; Welsh *et al.*, 2006). Die genaue biologische Funktion des Komplexes in Hefen ist jedoch noch unbekannt. Sowohl das Säuger-Homolog von Erv46p (ERGIC3) als auch das von Erv41p (ERGIC2) sind im ER-Golgi intermediären Kompartiment lokalisiert (Orci *et al.*, 2003). Moreau *et al.* (2011) postulierten, dass ERGIC2 eine entscheidende Komponente beim Golgi-ER-Transport von Ricin im Säuger darstellt. Da Erv46p nur im Komplex mit Erv41p seine Funktion ausüben kann, deutet das Resultat darauf hin, dass auch der Golgi-ER-Transport von RTA über einen ähnlichen Mechanismus ablaufen könnte. Daher sollte zukünftig auch der Effekt von $\Delta erv41$ auf den Toxintransport in Hefen charakterisiert werden. Aufgrund der starken Gemeinsamkeiten zwischen dem Transport von RTA und Ricin stellt sich die Frage, inwieweit RTB beim intrazellulären Transport eine Rolle spielt. Die Vermutung, dass RTB an KDEL-tragende Proteine im Golgi bindet und diese ausnutzt, um retrograd in das ER transportiert zu werden, wird durch die vorliegenden Untersuchungen nicht unterstützt. Sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen scheint RTA in der Lage zu sein, das Zytosol ohne RTB zu erreichen. Auch die starken Homologien im Endosom-Golgi-Transport von RTA und Ricin deuten darauf hin, dass der Toxintransport RTB-unabhängig erfolgt.

Aufbauend auf den Resultaten könnten neben den fehlenden Komponenten der untersuchten Komplexe auch weitere Deletionsmutanten getestet werden. Vor allem der Einfluss des essentiellen TRAPP- und COG-Komplexes sollte mit Hilfe von Überexpressionsstudien analysiert werden. Parallel zu den RTA-Untersuchungen sollte der retrograde Transport von

RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} mit Hilfe des GFP-Reportersystems näher analysiert werden, um mögliche Unterschiede in der Transportroute zu identifizieren.

Modell des retrograden Transports von RTA in Hefen

Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kann ein Transportmodell vorgestellt werden, welches die mögliche retrograde Transportroute von RTA im Modellorganismus *S. cerevisiae* beschreibt (Abbildung 59).

Die Respirationsuntersuchungen von $\Delta end3$ haben gezeigt, dass die Internalisierung von RTA durch Endozytose vermittelt wird. Mit Hilfe des Reportersystems konnten drei weitere Proteine (Snc1p, Sso1p und Syn8p) identifiziert werden, die beim Toxintransport von der Plasmamembran zum frühen Endosom eine entscheidende Rolle übernehmen, wobei deren genaue Funktion noch unklar ist. Die anschließende Abschnürung der RTA beladenen Vesikel und deren Trafficking vom Endosom zum TGN erfolgt Retromer-unabhängig und ohne die Beteiligung der Sorting-Nexine Snx41p und Snx4p. Auch der Transport über COPIB-Vesikel kann anhand der Resultate ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigen die bisherigen Resultate, dass das Andocken der RTA-beladenen Vesikel an die Golgi-Membran einerseits durch die Komponenten Vps54p und Vps51p des GARP-Komplexes initiiert und andererseits durch die GTPase Ypt6p reguliert wird. Neben der Rekrutierung von Vps54p und Vps51p ist Ypt6p wohl auch für die spätere Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran verantwortlich. Nach dem Andockschrift scheint Sft2p für die Erkennung der RTA-beladenen Vesikel verantwortlich zu sein, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch noch weitere t-SNAREs, wie z. B. Vti1p oder Tlg1p, an diesem Prozess beteiligt sind. Auch die Beteiligung des v-SNARE Snc1p bei der Erkennung der Vesikel kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, obwohl das Protein wohl eher bei der Endozytose von RTA eine Rolle spielt. Im Gegensatz zum Ricin-Transport scheint Tlg2p zumindest in Hefen eine untergeordnete Funktion beim Transport von RTA einzunehmen. Der intra-Golgi-Transport von RTA konnte mit Hilfe des Testsystems nicht näher charakterisiert werden, wobei der TRAPP- und der COG-Komplex vielversprechende Kandidaten darstellen, da sie bereits mit dem Transport von Ricin in Verbindung gebracht wurden (Moreau *et al.*, 2011). Auch beim Golgi-ER-Transport konnten mit Erv46p und Sec22p Gemeinsamkeiten zwischen dem Trafficking von RTA und dem von Ricin beobachtet werden. Die Beteiligung von Rer1p zeigt zudem, dass weitere alternative Transportwege für RTA existieren. Wie bereits beim Endosom-Golgi-Transport scheinen ebenfalls GTPasen, in diesem Fall die Arf-GTPasen, eine wichtige Rolle bei der Regulation des RTA-Transports zu spielen. Aufgrund der Beteiligung

von Hrd1p und Der1p kann davon ausgegangen werden, dass die ER-Zytosol-Retrotranslokation von RTA wie nach intrazellulärer RTA-Expression mit Hilfe der ERAD-Maschinerie erfolgt (Li *et al.*, 2011a). Der resistente Phänotyp von $\Delta rpl12B$ bei den Respirationsmessungen belegt zudem, dass RTA abschließend die Ribosomen im Zytosol der Hefe inaktiviert.

Die externe Applikation von RTA liegt somit sehr nahe an der natürlichen Intoxifikationsroute von Ricin. Auch die Gemeinsamkeiten zwischen dem Transport von RTA und Ricin unterstreichen, dass das etablierte Testsystem hervorragend zur Analyse des retrograden Transports von RTA im Modellorganismus *S. cerevisiae* geeignet ist.

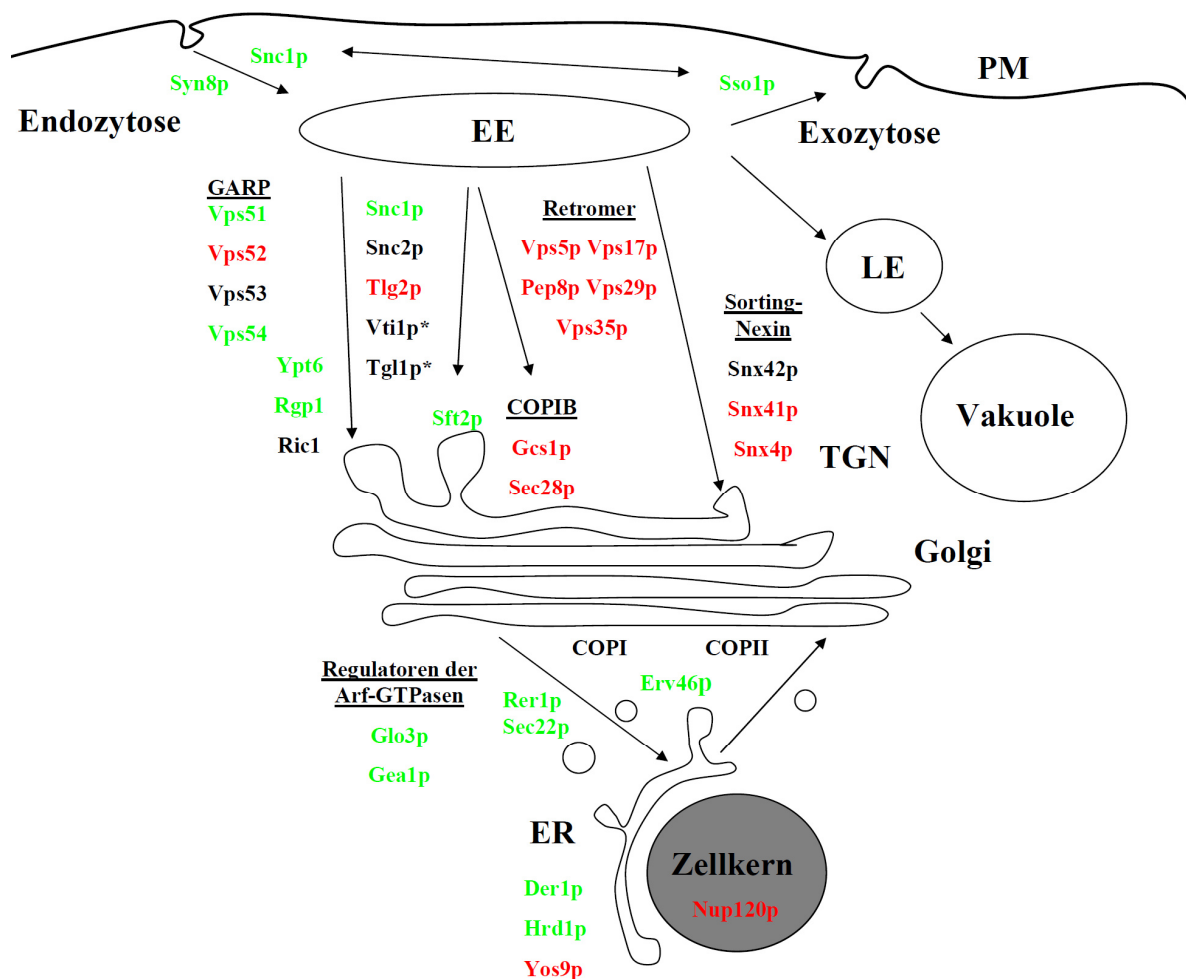


Abbildung 59: Modell des intrazellulären RTA-Transports in Hefe. Proteine, die eine Rolle beim Toxintransport spielen sind in grün dargestellt, während nicht-involvierte Proteine rot markiert sind. Proteine in schwarzer Schrift wurden nicht in dieser Studie untersucht. Bei den mit * markierten Proteinen handelt es sich um essentielle Proteine, die mit Hilfe des GFP-Reportertestsystems nicht analysiert werden können. (EE = Frühe Endosomen, LE = Späte Endosomen, PM = Plasmamembran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, TGN = Trans-Golgi-Netzwerk). Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

ER-Importstudien von K28pp_{SS}-RTA in Hefen

Neben den in der vorliegenden Arbeit entwickelten hefebasierten *in vivo* Testsystemen existiert bereits ein artifizielles Modellsystem in Hefe, mit dessen Hilfe der finale ER-Zytosol-Retrotranslokationsschritt von RTA nachgestellt werden kann (Li *et al.*, 2011a; Simpson *et al.*, 1999). Dabei wird der Import von RTA in das ER durch das Anfügen einer N-terminalen ER-Signalsequenz ermöglicht. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die natürliche Signalsequenz des Ricin-Vorläufertoxins sowie das Importsignal des Hefechaperons Kar2p einen effizienten ER-Import gewährleisten (Allen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011a; Parikh *et al.*, 2008). Obwohl auch die N-terminale Fusion der Prä-Signalsequenz des Killertoxins K28 eine *in vivo* Toxizität von RTA in *S. cerevisiae* vermittelt, konnte der anschließende ER-Import der Toxininfusion bislang noch nicht nachgewiesen werden (Schnöder, 2009). Dennoch deutet die verminderte *in vivo* Toxizität des Toxinkonstrukts in Mutanten mit Defekten im posttranslationalen ER-Import sowie im Signalpeptidase-Komplex indirekt auf einen Eintritt in das ER hin. Schnöder (2009) stellte die Vermutung auf, dass der Grund für den eingeschränkten Import von K28-RTA auf einer fehlenden, toxinspezifischen Pro-Region beruht. Über die Funktion der 13 AS langen Pro-Region von K28 ist bisher wenig bekannt (Riffer *et al.*, 2002). Bei anderen Vorläuferproteinen scheint die Pro-Region eine Chaperon-ähnliche Funktion zu übernehmen, um die korrekte Faltung des Proteins zu unterstützen (Lesage *et al.*, 2003). Außerdem kann sie als „Spacer“ fungieren, wodurch die Erkennung der Signalsequenz beim ER-Import erleichtert wird (Jolliffe *et al.*, 2006). Die Hydrophobizität der Signalpeptid-Region von K28 wird durch das Fehlen der Pro-Region verringert, was möglicherweise Auswirkungen auf den ER-Import hat (Schnöder, 2009).

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit eine wildtypische und mutierte RTA-Toxinvariante mit N-terminaler Prä-Pro-Signalsequenz von K28 hergestellt und die *in vivo* Toxizität sowie der ER-Import der Toxinvarianten näher charakterisiert. Dabei induzierte die intrazelluläre Expression der wildtypischen Toxininfusion ein vermindertes Zellwachstum in *S. cerevisiae*, wohingegen bei der mutierten Toxinvariante ein resistenter Phänotyp erkennbar war. Auch bei der K28-RTA-Variante ohne Pro-Region konnten ähnliche Resultate beobachtet werden (Schnöder, 2009). Die Wachstumstests bestätigen zudem, dass die zusätzliche Pro-Region keinen negativen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von RTA hat. Mit Hilfe der radioaktiven Markierung konnte ebenfalls die *in vivo* Expression der K28pp_{SS}-RTA^{E177D}-Variante belegt werden. Wie bereits bei Schnöder (2009) war jedoch nur eine immunreaktive Bande auf Höhe der als Referenz mitgeführten *in vitro* Probe (unprozessierte

Toxinvariante, ca. 37,2 kDa) zu erkennen. Aus früheren Arbeiten ist jedoch bekannt, dass RTA nach dem Eintritt in das ER posttranslational modifiziert wird, wobei mindestens eine der zwei potentiellen Glykosylierungsstellen von RTA glykosyliert wird (Simpson *et al.*, 1999). Daher konnten beispielsweise bei Kar2-RTA, welches effizient in das ER-Lumen importiert wird, *in vivo* zwei immunreaktive Banden detektiert werden. Die untere Bande entsprach dabei prozessiertem, unglykosyliertem RTA, während die obere Bande die glykosylierte Form darstellte (Li *et al.*, 2011a). Um sicherzustellen, dass es sich bei der detektierten Bande um die glykosylierte, importierte Form und nicht um den unprozessierten, zytosolischen Vorläufer von RTA handelt, wurde zusätzlich eine EndoH-Behandlung durchgeführt. Das Enzym EndoH entfernt dabei die angefügten Glykosylierungen, in dem es die Bindung zwischen zwei N-Acetylglukosamin-Molekülen spaltet (Maley *et al.*, 1989). Bei einer vorhandenen Glykosylierung wäre aufgrund der EndoH-Behandlung eine Verringerung der Bandengröße im SDS-Gel zu erwarten gewesen, was jedoch nicht gezeigt werden konnte. Auch in Anwesenheit eines Proteasomeninhibitors, der einen raschen Abbau der importierten, glykosylierten RTA-Form verhindern sollte, konnten weder zwei immunreaktive Banden noch die Glykosylierung von RTA nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten somit, dass es sich höchst wahrscheinlich um die unprozessierte Vorläuferform von RTA handelte. Die Resultate von K28pp_{SS}-RTA sind somit vergleichbar mit den Ergebnissen von K28-RTA ohne Pro-Region (Schnöder, 2009). Die Vermutung, dass die Pro-Region zu einem verbesserten Import von RTA führt, konnte nicht bestätigt werden. Des Weiteren bleibt die Funktion der Pro-Region von K28 weiterhin unklar, wobei eine mögliche Rolle beim ER-Import eher unwahrscheinlich ist. Zudem ist die K28-Signalsequenz ungeeignet zur Untersuchung der ER-Zytosol-Retrotranslokation in Hefen, da ein effizienter und nachweisbarer ER-Import von RTA nicht gewährleistet ist. Die Wahl der Signalsequenz scheint sich entscheidend auf die an der Retrotranslokation von RTA beteiligten Proteine auszuwirken. Für K28-RTA spielt beispielsweise der Doa10-Komplex sowie der Cdc48-Komplex eine wichtige Rolle, während bei der ER-luminalen Kar2-RTA-Variante beide Komplexe keinen Einfluss besitzen, obwohl theoretisch RTA nach Abspaltung des Signalpeptids im ER-Lumen identische Proteine für die ER-Zytosol-Retrotranslokation nutzen sollte (Li *et al.*, 2011a; Schnöder, 2009). Daher bleibt unklar, ob die intrazelluläre RTA-Expression ein geeignetes Modell für die Untersuchung des Toxintransports darstellt. Im Gegensatz dazu stellt das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Testsystem eine vielversprechende Alternative dar, da es Signalsequenz-unabhängig ist und somit der Transport von RTA nicht durch eine Signalsequenz beeinflusst werden kann.

5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur heterologen Expression von RTA dienten zunächst der Bereitstellung ausreichend großer Mengen an biologisch aktiven Toxinvarianten, welche dann in der späteren Analyse des intrazellulären Toxintransports verwendet wurden. Obwohl die Herstellung aller Toxinvarianten in *E. coli* erfolgreich verlief, sollte künftig deren Lagerung optimiert werden, um die biologische Aktivität über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Eine weitere Optimierung der RTA-Produktion kann dabei nur individuell unter kontrollierbaren Bedingungen in einem Bioreaktor erfolgen, wobei die bisher ermittelten Parameter als Grundlage dienen können. Zusätzlich ist in der Literatur beschrieben, dass das Anfügen eines His₆-Tag eine gesteigerte Bindungskapazität und *in vivo* Toxizität des Letal-Faktors des Anthrax-Toxins zur Folge hat (Neumeyer *et al.*, 2006). Um auch einen möglichen Einfluss des verwendeten His₆-Tags auf den retrograden Transport von RTA auszuschliessen, könnten zukünftig Toxinvarianten mit N-terminalem Tag und zusätzlicher Enterokinase-Schnittstelle, wie z. B. einer TEV-Protease-Schnittstelle, hergestellt werden, bei denen das Tag nach der Reinigung entfernt werden kann. Auch die Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wäre sinnvoll, um die einzelnen Varianten besser miteinander vergleichen und mögliche negative Auswirkungen der Reinigung und Lagerung detektieren zu können (Chaddock und Roberts, 1993). Mittelfristig sollte auch der Nachweis der *in vivo* Toxizität über ein nicht-enzymbasiertes Testsystem erfolgen, um eine sensitivere und frühzeitigere Detektion des toxischen Effekts zu ermöglichen. Dabei könnte der Nachweis entweder über die Bestimmung der Proteinbiosynthesehemmung durch den Einbau von Radioisotopen oder über eine RT-PCR-basierte Detektion der 28S rRNA-Depurinierung stattfinden (Pierce *et al.*, 2011; Rapak *et al.*, 1997; Wales *et al.*, 1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war der biochemische Nachweis der Toxinaufnahme nicht gelungen. Eine Möglichkeit dies in Zukunft zu ändern, stellt die nachträgliche Markierung der RTA-Varianten mit radioaktivem I¹²⁵ dar. In früheren Studien konnte die Endozytose und der Transport von Ricin im Säugerzellen mit dieser Technik biochemisch untersucht werden (Klokk *et al.*, 2011; Rapak *et al.*, 1997). Damit könnten in Zukunft nicht nur der zeitliche und räumliche Transport von RTA-Varianten im Säuger charakterisiert, sondern auch neue Interaktionspartner durch Immunpräzipitationsstudien identifiziert sowie die Effekte von Inhibitoren auf den RTA-Transport beschrieben werden.

Auch die Visualisierung der RTA-Aufnahme und des intrazellulären Transports eröffnen vielfältige Möglichkeiten, die Prozesse sowie die daran beteiligten Proteine zu charakterisieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein entscheidender Schritt durch die Herstellung aktiver, fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten erzielt werden. Auch die Toxinaufnahme wurde teilweise bestätigt, wobei in Zukunft die Parameter, wie z. B. Toxinmenge, Zellzahl und Inkubationszeit, durch Variation der Bedingungen optimiert werden sollten, um eine optimale Toxinaufnahme zu garantieren. Ebenso sollte die Endozytose sowie der Transport der RTA-Varianten über mehrere Stunden in Echtzeit mittels CLSM analysiert werden. Ein langfristiges Ziel wäre dabei die Charakterisierung der Dynamik der Endozytose der einzelnen RTA-Varianten mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Koloalisation zwischen eGFP-RTA^{HDEL} und Erd23 ein erster potentieller Interaktionspartner beschrieben werden. Aufbauend auf den gewonnenen Ergebnissen sollte in Zukunft die Interaktion zwischen der HDEL-tragenden RTA-Toxinvariante und dem Erd23-Rezeptor näher charakterisiert werden. Neben dem biochemischen Nachweis der Interaktion sollte geklärt werden, ob die Interaktion bereits auf Ebene der Plasmamembran oder erst nach Endozytose erfolgt. In Hefen gibt es bereits erste Hinweise, dass das Pendant der säugerspezifischen Erd23-Rezeptors, Erd2p, in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran koloalisiert, was jedoch noch nicht im Säuger bestätigt werden konnte (Dausend, 2011). Daher sollte zukünftig die Koloalisation von Erd23 an der Plasmamembran in Säugerzellen bestätigt werden. Dabei könnte beispielsweise der Rezeptor in einem potentiellen extrazellulären Bereich mit der α -Bungarotoxin-Bindestelle auf genetischer Ebene markiert werden. Durch Zugabe von fluoreszenzmarkiertem α -Bungarotoxin, welches mit hoher Affinität an dieses Tag bindet und selbst nicht in die Zelle eindringt, könnte so eine eventuelle Lokalisation des Erd23-Rezeptors auf Ebene der Plasmamembran detektiert werden (Kumari *et al.*, 2008; Sekine-Aizawa und Haganir, 2004; Wilkins *et al.*, 2008). Des Weiteren könnte die Beteiligung der KDEL-Rezeptoren am Transport von RTA^{HDEL} durch den siRNA-Knockdown einzelner oder mehrerer Rezeptoren und deren Auswirkung auf die *in vivo* Toxizität untersucht werden. Außerdem wäre es interessant zu klären, ob auch die Absättigung der Rezeptoren durch die intrazelluläre Überexpression HDEL-tragender Testproteine, wie z. B. mCherry^{HDEL} oder GFP^{HDEL}, zu einer Verringerung der *in vivo* Toxizität in Säugerzellen führt. Beim KDEL-tragenden *Pseudomonas* Exotoxin A hatte beispielsweise die intrazelluläre Überexpression des Proteins Lysozym^{KDEL} einen protektiven Effekt (Bard *et al.*, 2003; Sandvig *et al.*, 2010b).

Zukünftig sollten weiterführende Untersuchungen zur Beteiligung des Sec61-Komplexes am Transport von RTA^{KDEL} und RTA^{HDEL} durchgeführt werden. Dabei sollte vorrangig die Frage geklärt werden, ob die Verringerung der *in vivo* Toxizität beider Toxinvarianten direkt oder indirekt auf den Proteinverlust von Sec61 α zurückzuführen ist. Jedoch ist die Fragestellung nicht leicht zu adressieren. Eventuell könnte ein ähnlicher Versuchsansatz wie bei Rapak *et al.* (1997) eingesetzt werden. Diese konnten durch das Anfügen einer zusätzlichen Tyrosin-Sulfatierungsstelle bzw. Glykosylierungsstelle die Menge an Toxin bestimmen, die den Golgi-Apparat und das ER erreicht haben. Damit könnte die Menge an Toxin bestimmt werden, die bei gesilenceten und ungesilenceten Zellen den Golgi-Apparat sowie das ER erreichen. Ein nicht-vorhandener Unterschied in der Toxinmenge würde dabei auf eine direkte Rolle von Sec61 α am ER-Zytosol-Transport hindeuten, wohingegen bei einer unterschiedlichen Toxinmenge ein indirekter Einfluss wahrscheinlicher wäre.

Auch die Etablierung der hefebasierten Testsysteme bietet eine Reihe von neuen Möglichkeiten. So kann künftig die Beteiligung weiterer Proteine am Toxintransport analysiert werden. Besonders interessant wäre dabei die Untersuchung der hefespezifischen Arf-GTPasen, für deren Regulatoren Glo3p und Gea1p bereits ein Einfluss im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Zudem sollte mit Hilfe der Δ erd2 Deletionsmutante YA12 geklärt werden, wie sich ein Verlust des HDEL-Rezeptors Erd2p auf den Transport von RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} in Hefen auswirkt. Um den Einfluss von essentiellen Hefegenen, wie z. B. den Komponenten des TRAPP- und COG-Komplexes, zu testen, sollten die einzelnen Proteine überexprimiert und die Auswirkungen auf die *in vivo* Toxizität von RTA mit Hilfe des GFP-Fluoreszenz-Testsystems charakterisiert werden. Außerdem sollte die Rolle von Rer1p am Ricin-Transport in Säugerzellen untersucht werden. Dies könnte beispielsweise durch siRNA-Knockdown oder durch Kollokalisationsstudien überprüft werden. Eventuell könnte auch der Transport von Ricin mit Hilfe des neuen Testsystems in Hefen analysiert und mit den Ergebnissen von RTA verglichen werden. Dies könnte zeigen, ob der intrazelluläre Toxintransport in Anwesenheit der B-Kette wesentlich vom retrograden Transport von RTA abweicht.

Diese Ansatzpunkte können mittel- und langfristig dazu beitragen, den retrograden Transport von RTA in Hefen und Säugerzellen aufzuklären sowie die Beteiligung des Sec61-Translokons am Ricin-Transport zu untermauern.

6. Zusammenfassung

Viele bakterielle, pflanzliche und viral-kodierte A/B-Toxine nutzen die retrograden Transportmechanismen der Zielzellen aus, um ihre katalytische A-Untereinheit zum Wirkungsort zu transportieren. Auch das im Samen von *Ricinus communis* vorkommende A/B-Toxin Ricin wird nach Bindung von RTB an Galaktose-haltige Strukturen auf der Zelloberfläche endozytiert und retrograd von den endosomalen Kompartimenten über den Golgi-Apparat in das ER transportiert. Anschließend werden die beiden Untereinheiten voneinander getrennt und RTA disloziert vermutlich unter Ausnutzung der ER-assoziierten Proteindegradation aus dem ER-Lumen in das Zytosol. Danach kann sich die katalytische A-Untereinheit der proteasomalen Degradation teilweise entziehen und die eukaryotischen Ribosomen inaktivieren, was den Tod der Zelle zur Folge hat.

Die molekularen Mechanismen sowie die am Toxintransport beteiligten Proteine sind bislang noch weitgehend unbekannt, weshalb bis heute auch noch keine effektive Behandlung von Ricin-Intoxifikationen möglich ist. Um zukünftig neue Therapiestrategien zu etablieren, stellt die Charakterisierung der Transportmechanismen ein primäres Ziel der Forschung dar. Bisherige Bemühungen zur Entwicklung effizienter Inhibitoren erzielten meist nur starke Nebenwirkungen bei geringer Spezifität. Um die Intoxifikation von Ricin künftig gezielter behandeln und hemmen zu können, ist ein detailliertes Verständnis des intrazellulären Toxintransports von essentieller Bedeutung. Dieses Wissen könnte zudem helfen, das Potential von Ricin auch zur Bekämpfung von Krankheiten, wie z. B. Krebs, zu nutzen. Bisherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass RTA auch ohne die zellbindende B-Untereinheit eine toxische Wirkung in Säugerzellen induziert; die zugrunde liegenden Mechanismen und Transportrouten sind auch hier noch weitgehend unbekannt. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der intrazelluläre Transport verschiedener RTA-Varianten in Säugerzellen und im Modellorganismus *S. cerevisiae* näher analysiert.

Dabei konnten RTA, RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} sowie die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten in *E. coli* in größeren Mengen exprimiert und durch Affinitätschromatographie Verfahren gereinigt werden. Im Vergleich zu RTA und eGFP-RTA konnte nach Behandlung mit RTA^{HDEL/KDEL} bzw. eGFP-RTA^{HDEL/KDEL} eine erhöhte *in vivo* Toxizität der Konstrukte beobachtet werden, womit gleichzeitig deren biologische Aktivität belegt wurde.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegten, dass eGFP-RTA^{HDEL} von HeLa-Zellen internalisiert wird und eine Kolo-kalisation mit dem HDEL-Rezeptor Erd23 aufweist. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise dafür, dass die säugerspezifischen KDEL-Rezeptoren vermutlich auch am retrograden Transport von RTA^{HDEL} beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass der Knockdown von Sec61 α eine verringerte Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber RTA^{KDEL} und RTA^{HDEL} verursacht, was auf eine Beteiligung des Sec61-Translokons am Toxintransport hindeutet.

Des Weiteren wurde ein intrazelluläres RTA-Expressionsystem in Säugerzellen etabliert, mit dessen Hilfe die *in vivo* Toxizität verschiedener RTA-Varianten charakterisiert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die intrazelluläre Expression einer Toxinvariante mit zusätzlichem ER-Importsignal im Unterschied zur zytosolischen Expression eine weitaus stärkere Abnahme der Vitalität von HeLa-Zellen verursacht.

Zudem konnte erstmals die *in vivo* Toxizität von extern appliziertem RTA, RTA^{HDEL} und RTA^{KDEL} in Hefen belegt werden. Im Unterschied zu Säugerzellen hatte lediglich das Anfügen eines HDEL-Motivs eine erhöhte Toxizität von RTA zur Folge, während RTA^{KDEL} sowie RTA eine schwächere toxische Wirkung zeigten.

Abschließend konnten zwei innovative Testsysteme zur Analyse des retrograden Transports von RTA in *S. cerevisiae* entwickelt werden, welches erstmals ein in sich schlüssiges Modell zum RTA-Transport in Hefen ermöglichte. Hierbei konnten starke Gemeinsamkeiten zwischen dem RTA-Transport in Hefen einerseits und dem Transport von Ricin in Säugerzellen andererseits beobachtet werden. In Hefen spielen der GARP-Komplex, Sft2p sowie Ypt6p eine entscheidende Rolle, wobei deren Homologe auch mit dem Transport von Ricin in Verbindung gebracht werden. Der fehlende Einfluss des Retromers sowie der COPIB-Vesikel deckt sich ebenfalls mit den Säugerdaten von Ricin. Des Weiteren konnten neue Kandidatenproteine, wie z. B. Rer1p oder Glo3p, identifiziert werden, die bislang nicht mit dem Ricin-Transport in Verbindung gebracht wurden und künftig auch in Säugerzellen analysiert werden sollten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten somit neue Einblicke in den intrazellulären Transport von RTA im Säuger und in Hefen gewonnen werden und wichtige Grundlagen für den künftigen Einsatz des Hefemodells zur Untersuchung des retrograden Transports von RTA etabliert werden.

7. Literatur

- Aalto, M. K., Ronne, H. und Keranen, S. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *Embo J* (1993) 12, 4095-4104.
- Abrami, L., Reig, N. und van der Goot, F. G. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* (2005) 13, 72-78.
- Agarwal, R., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., Dunn, J. J. und Swaminathan, S. Cloning, high level expression, purification, and crystallization of the full length *Clostridium botulinum* neurotoxin type E light chain. *Protein Expr Purif* (2004) 34, 95-102.
- Aitchison, J. D., Blobel, G. und Rout, M. P. Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport. *J Cell Biol* (1995) 131, 1659-1675.
- Akbari, N., Khajeh, K., Rezaie, S., Mirdamadi, S., Shavandi, M. und Ghaemi, N. High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through in vitro refolding. *Protein Expr Purif* (2010) 70, 75-80.
- Alami, M., Taupiac, M. P., Reggio, H., Bienvenue, A. und Beaumelle, B. Involvement of ATP-dependent *Pseudomonas* exotoxin translocation from a late recycling compartment in lymphocyte intoxication procedure. *Mol Biol Cell* (1998) 9, 387-402.
- Allen, S. C., Moore, K. A., Marsden, C. J., Fulop, V., Moffat, K. G., Lord, J. M., Ladds, G. und Roberts, L. M. The isolation and characterization of temperature-dependent ricin A chain molecules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs J* (2007) 274, 5586-5599.
- Amessou, M., Fradagrada, A., Falguieres, T., Lord, J. M., Smith, D. C., Roberts, L. M., Lamaze, C. und Johannes, L. Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J Cell Sci* (2007) 120, 1457-1468.
- Argent, R. H., Parrott, A. M., Day, P. J., Roberts, L. M., Stockley, P. G., Lord, J. M. und Radford, S. E. Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J Biol Chem* (2000) 275, 9263-9269.
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. und Bonifacino, J. S. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* (2004) 165, 123-133.
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J. und Osterloh, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *Jama* (2005) 294, 2342-2351.
- Badizadegan, K., Wheeler, H. E., Fujinaga, Y. und Lencer, W. I. Trafficking of cholera toxin-ganglioside GM1 complex into Golgi and induction of toxicity depend on actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* (2004) 287, C1453-1462.
- Baenziger, J. U. und Fiete, D. Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J Biol Chem* (1979) 254, 9795-9799.
- Balint, G. A. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicology* (1974) 2, 77-102.
- Baluna, R., Coleman, E., Jones, C., Ghetie, V. und Vitetta, E. S. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp Cell Res* (2000) 258, 417-424.
- Baluna, R. und Vitetta, E. S. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* (1997) 37, 117-132.
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y. und Beckmann, J. S. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta* (1983) 741, 123-127.
- Barbero, P., Bittova, L. und Pfeffer, S. R. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* (2002) 156, 511-518.
- Barbieri, L., Battelli, M. G. und Stirpe, F. Reduction of ricin and other plant toxins by thiol:protein disulfide oxidoreductases. *Arch Biochem Biophys* (1982) 216, 380-383.
- Barbieri, L., Ciani, M., Girbes, T., Liu, W. Y., Van Damme, E. J., Peumans, W. J. und Stirpe, F. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett* (2004) 563, 219-222.
- Barbieri, L., Polito, L., Bolognesi, A., Ciani, M., Pelosi, E., Farini, V., Jha, A. K., Sharma, N., Vivanco, J. M., Chambery, A., Parente, A. und Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1760, 783-792.
- Bard, F., Mazelin, L., Pechoux-Longin, C., Malhotra, V. und Jurdic, P. Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* (2003) 278, 46601-46606.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Schnell, R., Tawadros, S., Schinkothe, T., Lorenzen, J., Diehl, V. und Engert, A. Recombinant anti-CD25 immunotoxin RFT5(SCFV)-ETA' demonstrates successful elimination of disseminated human Hodgkin lymphoma in SCID mice. *Int J Cancer* (2000) 86, 718-724.

- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F. T. und Cassel, D. *The COPI system: molecular mechanisms and function*. FEBS Lett (2009) 583, 2701-2709.
- Becker, B. und Schmitt, M. J. *Adapting yeast as model to study ricin toxin A uptake and trafficking*. Toxins (2011) 3, 834-847.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J. *Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex*. Science (1997) 278, 2123-2126.
- Beh, C. T. und Rose, M. D. *Two redundant systems maintain levels of resident proteins within the yeast endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A (1995) 92, 9820-9823.
- Beyer, N. H., Kogutowska, E., Hansen, J. J., Engelhart Illigen, K. E. und Heegaard, N. H. *A mouse model for ricin poisoning and for evaluating protective effects of antiricin antibodies*. Clin Toxicol (Phila) (2009) 47, 219-225.
- Bjerling, P., Olsson, I. und Meng, X. *Quantitative live cell fluorescence-microscopy analysis of fission yeast*. J Vis Exp (2012).
- Bonifacino, J. S. und Glick, B. S. *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. Cell (2004) 116, 153-166.
- Bonifacino, J. S. und Hierro, A. *Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network*. Trends Cell Biol (2010) 21, 159-167.
- Bonifacino, J. S. und Rojas, R. *Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network*. Nat Rev Mol Cell Biol (2006) 7, 568-579.
- Botstein, D., Chervitz, S. A. und Cherry, J. M. *Yeast as a model organism*. Science (1997) 277, 1259-1260.
- Bradley, J. L., Silva, H. M. und McGuire, P. M. *Depurination of yeast 26S ribosomal RNA by recombinant ricin A chain*. Biochem Biophys Res Commun (1987) 149, 588-593.
- Brodsky, J. L. *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane*. Int Rev Cytol (1998) 178, 277-328.
- Bujny, M. V., Popoff, V., Johannes, L. und Cullen, P. J. *The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network*. J Cell Sci (2007) 120, 2010-2021.
- Burbage, C., Tagge, E. P., Harris, B., Hall, P., Fu, T., Willingham, M. C. und Frankel, A. E. *Ricin fusion toxin targeted to the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor is selectively toxic to acute myeloid leukemia cells*. Leuk Res (1997) 21, 681-690.
- Burgsh, H. G. *Toxic hazards: the castor bean*. N Eng J Med (1960) 262, 1039-1040.
- Burnette, W. N. *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem (1981) 112, 195-203.
- Burri, L., Varlamov, O., Doege, C. A., Hofmann, K., Beilharz, T., Rothman, J. E., Sollner, T. H. und Lithgow, T. *A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100, 9873-9877.
- Butterworth, A. G. und Lord, J. M. *Ricin and Ricinus communis agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor*. Eur J Biochem (1983) 137, 57-65.
- Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J. und Macreadie, I. *Alzheimer's Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response*. FEMS Yeast Res (2007) 7, 1230-1236.
- Calvin, N. M. und Hanawalt, P. C. *High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation*. J Bacteriol (1988) 170, 2796-2801.
- Campbell, S. G. und Ashe, M. P. *An approach to studying the localization and dynamics of eukaryotic translation factors in live yeast cells*. Methods Enzymol (2007) 431, 33-45.
- Cappel, S. *Funktionale Charakterisierung der ER-luminalen Proteine BIP, GRP170 und SIL1 hinsichtlich der Zellvitalität und der Protein-Biogenese*. Dissertation (2011), Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes.
- Cawley, D. B., Hedblom, M. L., Hoffman, E. J. und Houston, L. L. *Differential ricin sensitivity of rat liver and wheat germ ribosomes in polyuridylic acid translation*. Arch Biochem Biophys (1977) 182, 690-695.
- Chaddock, J. A. und Roberts, L. M. *Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain*. Protein Eng (1993) 6, 425-431.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science (1994) 263, 802-805.
- Chazaud, B., Muriel, M. P., Aubery, M. und Decastel, M. *Ricin toxicity and intracellular routing in tumoral HT-29 cells. I. Ricin routing and toxicity are related to the state of differentiation of HT-29 cells*. Exp Cell Res (1995) 221, 205-213.
- Chen, A., AbuJarour, R. J. und Draper, R. K. *Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI*. J Cell Sci (2003) 116, 3503-3510.
- Chen, A., Hu, T., Mikoryak, C. und Draper, R. K. *Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction*. Biochim Biophys Acta (2002) 1589, 124-139.

- Chen, C. C., Wu, J. K., Lin, H. W., Pai, T. P., Fu, T. F., Wu, C. L., Tully, T. und Chiang, A. S. Visualizing long-term memory formation in two neurons of the *Drosophila* brain. *Science* (2012) 335, 678-685.
- Chen, X. H., Liu, Q. und Zhan, J. B. [Construction and expression of ricin A chain and green fluorescent protein fusion gene in *E. coli*]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* (2005) 34, 201-206.
- Chiou, J. C., Li, X. P., Remacha, M., Ballesta, J. P. und Tumer, N. E. The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* (2008) 70, 1441-1452.
- Coe, J. G., Lim, A. C., Xu, J. und Hong, W. A role for *Tlg1p* in the transport of proteins within the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* (1999) 10, 2407-2423.
- Collier, R. J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* (2001) 39, 1793-1803.
- Conchon, S., Cao, X., Barlowe, C. und Pelham, H. R. *Got1p* and *Sft2p*: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *Embo J* (1999) 18, 3934-3946.
- Conibear, E. und Stevens, T. H. *Vps52p*, *Vps53p*, and *Vps54p* form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol Biol Cell* (2000) 11, 305-323.
- Cormack, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol* (1998) 1, 406-410.
- Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C. und Letourneur, F. New *COP1*-binding motifs involved in ER retrieval. *Embo J* (1998) 17, 6863-6870.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D. und Henco, K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* (1994) 31, 371-387.
- Dausend, J. In vivo Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors *Erd2p* und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe. Dissertation (2011), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Day, P. J., Ernst, S. R., Frankel, A. E., Monzingo, A. F., Pascal, J. M., Molina-Svinth, M. C. und Robertus, J. D. Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain. *Biochemistry* (1996) 35, 11098-11103.
- Day, P. J., Owens, S. R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L. M. und Lord, J. M. An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem* (2001) 276, 7202-7208.
- Decker, T. und Lohmann-Matthes, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* (1988) 115, 61-69.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M. und Lord, J. M. The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* (2002) 41, 3405-3413.
- Dertzbaugh, M. T., Rossi, C. A., Paddle, B. M., Hale, M., Poretski, M. und Alderton, M. R. Monoclonal antibodies to ricin: in vitro inhibition of toxicity and utility as diagnostic reagents. *Hybridoma* (2005) 24, 236-243.
- Deshpande, R. R. und Heinzle, E. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol Lett* (2004) 26, 763-767.
- Dickers, K. J., Bradberry, S. M., Rice, P., Griffiths, G. D. und Vale, J. A. Abrin poisoning. *Toxicol Rev* (2003) 22, 137-142.
- Dong, D. Y., Xu, J. J., Song, X. H., Fu, L. und Chen, W. [Expression and analysis of biological activity of the recombination anthrax edema factor]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* (2005) 45, 459-462.
- Dorland, R. B., Middlebrook, J. L. und Leppla, S. H. Receptor-mediated internalization and degradation of diphtheria toxin by monkey kidney cells. *J Biol Chem* (1979) 254, 11337-11342.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* (1988) 16, 6127-6145.
- Duden, R. ER-to-Golgi transport: *COP I* and *COP II* function. *Mol Membr Biol* (2003) 20, 197-207.
- Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L. und Schekman, R. *epsilon-COP* is a structural component of coatamer that functions to stabilize *alpha-COP*. *Embo J* (1998) 17, 985-995.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G. M. und Blattner, F. R. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* (2008) 190, 2597-2606.
- Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F. und Schmitt, M. J. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol* (2004) 70, 961-966.
- Eiklid, K., Olsnes, S. und Pihl, A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res* (1980) 126, 321-326.
- Eisfeld, K. Endozytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation (2001), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.

- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J. und Schmitt, M. J. *Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast*. Mol Microbiol (2000) 37, 926-940.
- el Baya, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robenek, H. und Schmidt, M. A. *Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication*. Eur J Cell Biol (1997) 73, 40-48.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. und Tuschl, T. *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev (2001) 15, 188-200.
- Endo, Y. und Tsurugi, K. *RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes*. J Biol Chem (1987) 262, 8128-8130.
- Endo, Y. und Tsurugi, K. *The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain*. Nucleic Acids Symp Ser (1988), 139-142.
- Engqvist-Goldstein, A. E. und Drubin, D. G. *Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals*. Annu Rev Cell Dev Biol (2003) 19, 287-332.
- Esnault, Y., Blondel, M. O., Deshaies, R. J., Scheckman, R. und Kepes, F. *The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum*. Embo J (1993) 12, 4083-4093.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. und Duden, R. *COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP*. Embo J (2000) 19, 3905-3917.
- Fairey, E. R. und Ramsdell, J. S. *Reporter gene assays for algal-derived toxins*. Nat Toxins (1999) 7, 415-421.
- Falnes, P. O. und Sandvig, K. *Penetration of protein toxins into cells*. Curr Opin Cell Biol (2000) 12, 407-413.
- Fan, F. und Wood, K. V. *Bioluminescent assays for high-throughput screening*. Assay Drug Dev Technol (2007) 5, 127-136.
- Fehrmann, F., Jung, M., Zimmermann, R. und Krausslich, H. G. *Transport of the intracisternal A-type particle Gag polyprotein to the endoplasmic reticulum is mediated by the signal recognition particle*. J Virol (2003) 77, 6293-6304.
- Ferens, W. A. und Hovde, C. J. *Escherichia coli O157:H7: animal reservoir and sources of human infection*. Foodborne Pathog Dis (2011) 8, 465-487.
- Ferrini, J. B., Martin, M., Taupiac, M. P. und Beaumelle, B. *Expression of functional ricin B chain using the baculovirus system*. Eur J Biochem (1995) 233, 772-777.
- Filipowicz, W. *RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine*. Cell (2005) 122, 17-20.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T. A., Hartmann, E. und Sommer, T. *A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of S. cerevisiae*. Embo J (1996) 15, 1482-1494.
- Fominaya, J. und Wels, W. *Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system*. J Biol Chem (1996) 271, 10560-10568.
- Francoeur, A. und Assalian, A. *Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1*. Biochemica (1996) 3, 19-25.
- Frankel, A. E., Laver, J. H., Willingham, M. C., Burns, L. J., Kersey, J. H. und Valleria, D. A. *Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin*. Leuk Lymphoma (1997) 26, 287-298.
- Frankel, A. E., Tagge, E. P. und Willingham, M. C. *Clinical trials of targeted toxins*. Semin Cancer Biol (1995) 6, 307-317.
- Fridmann-Sirkis, Y., Kent, H. M., Lewis, M. J., Evans, P. R. und Pelham, H. R. *Structural analysis of the interaction between the SNARE Tlg1 and Vps51*. Traffic (2006) 7, 182-190.
- Frigerio, L., Jolliffe, N. A., Di Cola, A., Felipe, D. H., Paris, N., Neuhaus, J. M., Lord, J. M., Ceriotti, A. und Roberts, L. M. *The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting*. Plant Physiol (2001) 126, 167-175.
- Frigerio, L., Vitale, A., Lord, J. M., Ceriotti, A. und Roberts, L. M. *Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts*. J Biol Chem (1998) 273, 14194-14199.
- Gaynor, E. C., Graham, T. R. und Emr, S. D. *COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way?* Biochim Biophys Acta (1998) 1404, 33-51.
- Gemmill, T. R. und Trimble, R. B. *Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species*. Biochim Biophys Acta (1999) 1426, 227-237.
- Gerlier, D. und Thomasset, N. *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. J Immunol Methods (1986) 94, 57-63.
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. und Tsien, R. Y. *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. Science (2006) 312, 217-224.
- Gießelmann, E. *Analyse der in vivo Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p*. Diplomarbeit (2007), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.

- Gießelmann, E.** *Endozytose und intrazellulärer Toxintransport in Hefe- und Säugerzellen mittels fluoreszenzmarkierter K28-Varianten.* Dissertation (2011), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A.** *Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure.* Yeast (1995) 11, 355-360.
- Girbes, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J. und Stürpe, F.** *Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria.* Mini Rev Med Chem (2004) 4, 461-476.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. und Pepperkok, R.** *Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum.* Nat Cell Biol (1999) 1, 423-430.
- Gorlich, D. und Rapoport, T. A.** *Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane.* Cell (1993) 75, 615-630.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D.** *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.* Proc Natl Acad Sci U S A (1990) 87, 4645-4649.
- Griffiths, G. und Simons, K.** *The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex.* Science (1986) 234, 438-443.
- Grimmer, S., Iversen, T. G., van Deurs, B. und Sandvig, K.** *Endosome to Golgi transport of ricin is regulated by cholesterol.* Mol Biol Cell (2000) 11, 4205-4216.
- Grimmer, S., Spilsberg, B., Hanada, K. und Sandvig, K.** *Depletion of sphingolipids facilitates endosome to Golgi transport of ricin.* Traffic (2006) 7, 1243-1253.
- Gurunathan, S., Chapman-Shimshoni, D., Trajkovic, S. und Gerst, J. E.** *Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis.* Mol Biol Cell (2000) 11, 3629-3643.
- Halban, P. A. und Irminger, J. C.** *Sorting and processing of secretory proteins.* Biochem J (1994) 299, 1-18.
- Hamilton, A. J. und Baulcombe, D. C.** *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.* Science (1999) 286, 950-952.
- Hampton, R. Y.** *ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation.* Curr Opin Cell Biol (2002) 14, 476-482.
- Hanahan, D.** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol (1983) 166, 557-580.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. und Nishimura, M.** *Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles.* Plant Cell (1998) 10, 825-836.
- Harata, N. C., Choi, S., Pyle, J. L., Aravanis, A. M. und Tsien, R. W.** *Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods.* Neuron (2006) 49, 243-256.
- Harley, S. M. und Beevers, H.** *Ricin inhibition of in vitro protein synthesis by plant ribosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A (1982) 79, 5935-5938.
- Hart, P. J.** *The cytosolic fate of ricin A chain in target cells.* PhD thesis (2010), Department of Biological Sciences, University of Warwick.
- Hartley, M. R. und Lord, J. M.** *Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants.* Biochim Biophys Acta (2004a) 1701, 1-14.
- Hartley, M. R. und Lord, J. M.** *Genetics of ribosome-inactivating proteins.* Mini Rev Med Chem (2004b) 4, 487-492.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Gorlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A.** *Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex.* Nature (1994) 367, 654-657.
- Hartree, E. F.** *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.* Anal Biochem (1972) 48, 422-427.
- Hartwell, L. H.** *Saccharomyces cerevisiae cell cycle.* Bacteriol Rev (1974) 38, 164-198.
- Haugland, R. P.** *Coupling of monoclonal antibodies with fluorophores.* Methods Mol Biol (1995) 45, 205-221.
- Hazes, B. und Read, R. J.** *Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells.* Biochemistry (1997) 36, 11051-11054.
- Heiligenstein, S., Eisfeld, K., Sendzik, T., Jimenez-Becker, N., Breinig, F. und Schmitt, M. J.** *Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD.* Embo J (2006) 25, 4717-4727.
- Henghold, W. B., 2nd.** *Other biologic toxin bioweapons: ricin, staphylococcal enterotoxin B, and trichothecene mycotoxins.* Dermatol Clin (2004) 22, 257-262, v.
- Hettema, E. H., Lewis, M. J., Black, M. W. und Pelham, H. R.** *Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes.* Embo J (2003) 22, 548-557.
- Ho, M., Chang, L. H., Pires-Alves, M., Thyagarajan, B., Bloom, J. E., Gu, Z., Aberle, K. K., Teymorian, S. A., Bannai, Y., Johnson, S. C., McArdle, J. J. und Wilson, B. A.** *Recombinant botulinum neurotoxin A heavy chain-based delivery vehicles for neuronal cell targeting.* Protein Eng Des Sel (2011) 24, 247-253.

- Hong, W.** SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1744, 120-144.
- Hoseki, J., Ushioda, R. und Nagata, K.** Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* (2010) 147, 19-25.
- Hutter, B. und John, G. T.** Evaluation of OxoPlate for real-time assessment of antibacterial activities. *Curr Microbiol* (2004) 48, 57-61.
- Ishizaki, T., Megumi, C., Komai, F., Masuda, K. und Oosawa, K.** Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol Plant* (2002) 114, 109-115.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. und Boyer, H. W.** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* (1977) 198, 1056-1063.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A.** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* (1983) 153, 163-168.
- Iversen, T. G., Skretting, G., Llorente, A., Nicoziani, P., van Deurs, B. und Sandvig, K.** Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell* (2001) 12, 2099-2107.
- Jablonowski, D., Frohloff, F., Fichtner, L., Stark, M. J. und Schaffrath, R.** *Kluyveromyces lactis* zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator. *Mol Microbiol* (2001) 42, 1095-1105.
- Jablonowski, D. und Schaffrath, R.** Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans* (2007) 35, 1533-1537.
- Jackson, M. E., Simpson, J. C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L. M. und Lord, J. M.** The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* (1999) 112 467-475.
- Janicot, M. und Desbuquois, B.** Fate of injected 125I-labeled cholera toxin taken up by rat liver in vivo. Generation of the active A1 peptide in the endosomal compartment. *Eur J Biochem* (1987) 163, 433-442.
- Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J. und Sommer, T.** Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* (2002) 3, 530-536.
- Jarosch, E., Lenk, U. und Sommer, T.** Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol* (2003) 223, 39-81.
- Johannes, L. und Popoff, V.** Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* (2008) 135, 1175-1187.
- Johannes, L. und Römer, W.** Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* (2010) 8, 105-116.
- John, G. T., Klimant, I., Wittmann, C. und Heinzle, E.** Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnol Bioeng* (2003) 81, 829-836.
- Jolliffe, N. A., Di Cola, A., Marsden, C. J., Lord, J. M., Ceriotti, A., Frigerio, L. und Roberts, L. M.** The N-terminal ricin propeptide influences the fate of ricin A-chain in tobacco protoplasts. *J Biol Chem* (2006) 281, 23377-23385.
- Kammermeier, P. J.** Surface clustering of metabotropic glutamate receptor 1 induced by long Homer proteins. *BMC Neurosci* (2006) 7, 1.
- Karmali, M. A.** Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol* (2004) 26, 117-122.
- Katzin, B. J., Collins, E. J. und Robertus, J. D.** Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins* (1991) 10, 251-259.
- Kelkel, M.** Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen α -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe. Dissertation (2009), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Kissa, K., Mordelet, E., Soudais, C., Kremer, E. J., Demeneix, B. A., Brulet, P. und Coen, L.** In vivo neuronal tracing with GFP-TTC gene delivery. *Mol Cell Neurosci* (2002) 20, 627-637.
- Klein, S.** Untersuchungen zur Wirkung und endozytotischen Aufnahme des A/B Toxins K28 an Säugerzellen. Diplomarbeit (2009), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Klokk, T. I., Lingelem, A. B., Myrann, A. G. und Sandvig, K.** Role of phospholipase $\alpha(2)$ in retrograde transport of ricin. *Toxins (Basel)* (2011) 3, 1203-1219.
- Kostrzewa, R. M. und Segura-Aguilar, J.** Botulinum neurotoxin: evolution from poison, to research tool--onto medicinal therapeutic and future pharmaceutical panacea. *Neurotox Res* (2007) 12, 275-290.
- Kozak, M.** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* (1986) 44, 283-292.
- Kreitman, R. J. und Pastan, I.** Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J* (1995) 307 29-37.
- Kumari, S., Borroni, V., Chaudhry, A., Chanda, B., Massol, R., Mayor, S. und Barrantes, F. J.** Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Biol* (2008) 181, 1179-1193.

- Kurzweilova, H. und Sigler, K. *Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1*. Folia Microbiol (Praha) (1993) 38, 524-526.
- Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature (1970) 227, 680-685.
- Lamb, F. I., Roberts, L. M. und Lord, J. M. *Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preprorizin*. Eur J Biochem (1985) 148, 265-270.
- Landel, C. P., Zhao, J., Bok, D. und Evans, G. A. *Lens-specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice*. Genes Dev (1988) 2, 1168-1178.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S. V., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., Jalal, C., Greiner, M., Hassdenteufel, S., Tatzelt, J., Kreutzer, B., Edelmann, L., Krause, E., Rettig, J., Somlo, S., Zimmermann, R. und Dudek, J. *Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells*. J Cell Sci (2012) 125, 1958-1969.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A. und Zimmermann, R. *Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels*. Channels (Austin) (2011) 5, 228-235.
- Lauvrak, S. U., Llorente, A., Iversen, T. G. und Sandvig, K. *Selective regulation of the Rab9-independent transport of ricin to the Golgi apparatus by calcium*. J Cell Sci (2002) 115, 3449-3456.
- Legler, P. M., Brey, R. N., Smallshaw, J. E., Vitetta, E. S. und Millard, C. B. *Structure of RiVax: a recombinant ricin vaccine*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2011) 67, 826-830.
- Lemley, P. V., Amanatides, P. und Wright, D. C. *Identification and characterization of a monoclonal antibody that neutralizes ricin toxicity in vitro and in vivo*. Hybridoma (1994) 13, 417-421.
- Lencer, W. I. *Retrograde transport of cholera toxin into the ER of host cells*. Int J Med Microbiol (2004) 293, 491-494.
- Lencer, W. I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M. G., Webb, H. M., Ruston, S., Madara, J. L., Hirst, T. R. und Holmes, R. K. *Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL*. J Cell Biol (1995) 131, 951-962.
- Lesage, G., Guimond, J. und Boileau, G. *trans-Complementation assay establishes the role of proregion hydrophobic amino acid residues in the biosynthesis of Saccharomyces cerevisiae Kex2p endoprotease*. Yeast (2003) 20, 397-406.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. und Cosson, P. *Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum*. Cell (1994) 79, 1199-1207.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. und Pelham, H. R. *Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes*. Mol Biol Cell (2000) 11, 23-38.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *A human homologue of the yeast HDEL receptor*. Nature (1990) 348, 162-163.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *Sequence of a second human KDEL receptor*. J Mol Biol (1992) 226, 913-916.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *A new yeast endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8*. Traffic (2002) 3, 922-929.
- Lewis, M. J., Sweet, D. J. und Pelham, H. R. *The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system*. Cell (1990) 61, 1359-1363.
- Lewis, S. M., Poon, P. P., Singer, R. A., Johnston, G. C. und Spang, A. *The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles*. Mol Biol Cell (2004) 15, 4064-4072.
- Li-Ya, A., Li, H. T., Zhou, M. H., Ha, S. und Tien, P. *Cloning, expression and purification of human heat shock protein GP96 gene in Escherichia coli*. Wei Sheng Wu Xue Bao (2004) 44, 834-836.
- Li, B. und Warner, J. R. *Mutation of the Rab6 homologue of Saccharomyces cerevisiae, YPT6, inhibits both early Golgi function and ribosome biosynthesis*. J Biol Chem (1996) 271, 16813-16819.
- Li, S., Spooner, R. A., Allen, S. C., Guise, C. P., Ladds, G., Schnoder, T., Schmitt, M. J., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum*. Mol Biol Cell (2011a) 21, 2543-2554.
- Li, X. P., Grela, P., Krokowski, D., Tchorzewski, M. und Tumer, N. E. *Pentameric organization of the ribosomal stalk accelerates recruitment of ricin A chain to the ribosome for depurination*. J Biol Chem (2010) 285, 41463-41471.
- Li, Y., Liao, X., Chen, G., Yap, Y. und Zhang, X. *Cloning, expression and purification of Microcystis viridis lectin in Escherichia coli*. Mol Biotechnol (2011b) 47, 105-110.
- Lieu, Z. Z. und Gleeson, P. A. *Identification of different itineraries and retromer components for endosome-to-Golgi transport of TGN38 and Shiga toxin*. Eur J Cell Biol (2010) 89, 379-393.
- Lin, J. Y., Tserng, K. Y., Chen, C. C., Lin, L. T. und Tung, T. C. *Abrin and ricin: new anti-tumour substances*. Nature (1970) 227, 292-293.
- Liu, Q., Zhan, J., Chen, X. und Zheng, S. *Ricin A chain reaches the endoplasmic reticulum after endocytosis*. Biochem Biophys Res Commun (2006) 343, 857-863.
- Liu, Y. und Barlowe, C. *Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function*. Mol Biol Cell (2002) 13, 3314-3324.

- Liu, Y., Flanagan, J. J. und Barlowe, C. *Sec22p export from the endoplasmic reticulum is independent of SNARE pairing*. J Biol Chem (2004) 279, 27225-27232.
- Llorente, A., Lauvrak, S. U., van Deurs, B. und Sandvig, K. *Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatomer protein (epsilon-COP)*. J Biol Chem (2003) 278, 35850-35855.
- Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S. L., van Deurs, B. und Sandvig, K. *Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus*. J Cell Biol (1998) 140, 553-563.
- Lord, J. M. *Precursors of ricin and Ricinus communis agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport*. Eur J Biochem (1985) 146, 411-416.
- Lord, J. M., Roberts, L. M. und Lencer, W. I. *Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation*. Curr Top Microbiol Immunol (2005) 300, 149-168.
- Lord, J. M., Roberts, L. M. und Robertus, J. D. *Ricin: structure, mode of action, and some current applications*. FASEB J (1994) 8, 201-208.
- Lord, M. J., Jolliffe, N. A., Marsden, C. J., Pateman, C. S., Smith, D. C., Spooner, R. A., Watson, P. D. und Roberts, L. M. *Ricin. Mechanisms of cytotoxicity*. Toxicol Rev (2003) 22, 53-64.
- Louis, K. S. und Siegel, A. C. *Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods*. Methods Mol Biol (2011) 740, 7-12.
- Luo, Z. und Gallwitz, D. *Biochemical and genetic evidence for the involvement of yeast Ypt6-GTPase in protein retrieval to different Golgi compartments*. J Biol Chem (2003) 278, 791-799.
- Ma, Q. J., Liu, C. X., Xiong, L. S. und Yu, X. Q. *B subunit of cholera toxin produced in Escherichia coli*. Sci China B (1991) 34, 274-280.
- MacDonald, P. E., Eliasson, L. und Rorsman, P. *Calcium increases endocytotic vesicle size and accelerates membrane fission in insulin-secreting INS-1 cells*. J Cell Sci (2005) 118, 5911-5920.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F. T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J. und Soling, H. D. *KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p*. J Cell Biol (1998) 143, 601-612.
- Majoul, I. V., Bastiaens, P. I. und Soling, H. D. *Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells*. J Cell Biol (1996) 133, 777-789.
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. und Plummer, T. H., Jr. *Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases*. Anal Biochem (1989) 180, 195-204.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. und Johannes, L. *Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport*. J Cell Biol (1998) 143, 973-990.
- Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. und Johannes, L. *Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform*. J Cell Biol (2002) 156, 653-664.
- Mantis, N. J., McGuinness, C. R., Sonuyi, O., Edwards, G. und Farrant, S. A. *Immunoglobulin A antibodies against ricin A and B subunits protect epithelial cells from ricin intoxication*. Infect Immun (2006) 74, 3455-3462.
- Marsh, E. K. und May, R. C. *Caenorhabditis elegans: a model organism for investigating immunity*. Appl Environ Microbiol (2012).
- Martinez-Martinez, I., Kaiser, C., Rohde, A., Ellert, A., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. und Luttmann, R. *High-level production of bacillus subtilis glycine oxidase by fed-batch cultivation of recombinant Escherichia coli Rosetta (DE3)*. Biotechnol Prog (2007) 23, 645-651.
- Matsuura, G., Morinaga, N., Yahiro, K., Komine, R., Moss, J., Yoshida, H. und Noda, M. *Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic Escherichia coli induces apoptosis in vero cells via mitochondrial membrane damage*. Infect Immun (2009) 77, 2919-2924.
- Mayerhofer, P. U., Cook, J. P., Wahlman, J., Pinheiro, T. T., Moore, K. A., Lord, J. M., Johnson, A. E. und Roberts, L. M. *Ricin A chain insertion into endoplasmic reticulum membranes is triggered by a temperature increase to 37 {degrees}C*. J Biol Chem (2009) 284, 10232-10242.
- McKenzie, J. E., Raisley, B., Zhou, X., Naslavsky, N., Taguchi, T., Caplan, S. und Sheff, D. *Retromer guides STxB and CD8-M6PR from early to recycling endosomes, EHD1 guides STxB from recycling endosome to Golgi*. Traffic (2012).
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I. und van Cappellen, W. A. *Tracking in cell and developmental biology*. Semin Cell Dev Biol (2009) 20, 894-902.
- Menetret, J. F., Hegde, R. S., Heinrich, S. U., Chandramouli, P., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A. und Akey, C. W. *Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes*. J Mol Biol (2005) 348, 445-457.
- Moazed, D., Robertson, J. M. und Noller, H. F. *Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA*. Nature (1988) 334, 362-364.

- Moffat, K. G., Gould, J. H., Smith, H. K. und O'Kane, C. J. Inducible cell ablation in *Drosophila* by cold-sensitive ricin A chain. *Development* (1992) 114, 681-687.
- Moisenovich, M., Tonevitsky, A., Maljuchenko, N., Kozlovskaya, N., Agapov, I., Volkmandt, W. und Bereiter-Hahn, J. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol* (2004) 121, 429-439.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. und Paganetti, P. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* (2003) 299, 1397-1400.
- Montanaro, L., Sperti, S., Mattioli, A., Testoni, G. und Stürpe, F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Inhibition of the binding of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate-ribosylated elongation factor 2 to ribosomes. *Biochem J* (1975) 146, 127-131.
- Montfort, W., Villafranca, J. E., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N. H., Hamlin, R. und Robertus, J. D. The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J Biol Chem* (1987) 262, 5398-5403.
- Moreau, D., Kumar, P., Wang, S. C., Chaumet, A., Chew, S. Y., Chevalley, H. und Bard, F. Genome-wide RNAi screens identify genes required for Ricin and PE intoxications. *Dev Cell* (2011) 21, 231-244.
- Morre, D. J., Morre, D. M., Mollenhauer, H. H. und Reutter, W. Golgi apparatus cisternae of monensin-treated cells accumulate in the cytoplasm of liver slices. *Eur J Cell Biol* (1987) 43, 235-242.
- Musshoff, F. und Madea, B. Ricin poisoning and forensic toxicology. *Drug Test Anal* (2009) 1, 184-191.
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. und Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* (1997) 204, 205-208.
- Napier, R. M., Fowke, L. C., Hawes, C., Lewis, M. und Pelham, H. R. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* (1992) 102, 261-271.
- Neumeyer, T., Tonello, F., Dal Molin, F., Schiffler, B., Orlik, F. und Benz, R. Anthrax lethal factor (LF) mediated block of the anthrax protective antigen (PA) ion channel: effect of ionic strength and voltage. *Biochemistry* (2006) 45, 3060-3068.
- Newman, A. P., Shim, J. und Ferro-Novick, S. BET1, BOS1, and SEC22 are members of a group of interacting yeast genes required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Mol Cell Biol* (1990) 10, 3405-3414.
- Nilsson, L. und Nygard, O. The mechanism of the protein-synthesis elongation cycle in eukaryotes. Effect of ricin on the ribosomal interaction with elongation factors. *Eur J Biochem* (1986) 161, 111-117.
- Nishikawa, S. und Nakano, A. Identification of a gene required for membrane protein retention in the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90, 8179-8183.
- O'Kane, C. J. und Moffat, K. G. Selective cell ablation and genetic surgery. *Curr Opin Genet Dev* (1992) 2, 602-607.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K. und Mori, K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* (2006) 172, 383-393.
- Olsnes, S. Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. *Methods Enzymol* (1978) 50, 330-335.
- Olsnes, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* (2004) 44, 361-370.
- Olsnes, S. und Pihl, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* (1973) 12, 3121-3126.
- Orci, L., Ravazzola, M., Mack, G. J., Barlowe, C. und Otte, S. Mammalian Erv46 localizes to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment and to cis-Golgi cisternae. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100, 4586-4591.
- Otte, S. und Barlowe, C. The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *Embo J* (2002) 21, 6095-6104.
- Parikh, B. A., Tortora, A., Li, X. P. und Tumer, N. E. Ricin inhibits activation of the unfolded protein response by preventing splicing of the HAC1 mRNA. *J Biol Chem* (2008) 283, 6145-6153.
- Parikh, B. A. und Tumer, N. E. Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev Med Chem* (2004) 4, 523-543.
- Patocka, J. und Streda, L. Protein biotoxins of military significance. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2006) 49, 3-11.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J. C., Wilce, M. C., Rossjohn, J., Talbot, U. M. und Paton, J. C. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* (2006) 443, 548-552.
- Paton, A. W. und Paton, J. C. *Escherichia coli* Subtilase Cytotoxin. *Toxins (Basel)* (2010) 2, 215-228.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. und Piston, D. W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* (1997) 73, 2782-2790.
- Pawar, V., De, A., Briggs, L., Omar, M. M., Sweeney, S. T., Lord, J. M., Roberts, L. M., Spooner, R. A. und Moffat, K. G. RNAi screening of *Drosophila* (*Sophophora*) *melanogaster* S2 cells for ricin sensitivity and resistance. *J Biomol Screen* (2011) 16, 436-442.

- Perez-Victoria, F. J. und Bonifacino, J. S.** Dual roles of the mammalian GARP complex in tethering and SNARE complex assembly at the trans-golgi network. *Mol Cell Biol* (2009) 29, 5251-5263.
- Petty, H. R.** Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc Res Tech* (2007) 70, 687-709.
- Peumans, W. J., Hao, Q. und Van Damme, E. J.** Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *Faseb J* (2001) 15, 1493-1506.
- Peyroche, A., Paris, S. und Jackson, C. L.** Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast *Gea1* protein. *Nature* (1996) 384, 479-481.
- Phillips, G. J.** Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* (2001) 204, 9-18.
- Pierce, M., Kahn, J. N., Chiou, J. und Tumer, N. E.** Development of a quantitative RT-PCR assay to examine the kinetics of ribosome depurination by ribosome inactivating proteins using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. *Rna* (2011) 17, 201-210.
- Pilon, M., Schekman, R. und Romisch, K.** Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* (1997) 16, 4540-4548.
- Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A. und Johnston, G. C.** Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *Embo J* (1999) 18, 555-564.
- Popoff, V., Mardones, G. A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J. S., Raposo, G. und Johannes, L.** The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J Cell Sci* (2007) 120, 2022-2031.
- Prasher, D. C.** Using GFP to see the light. *Trends Genet* (1995) 11, 320-323.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J.** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* (1992) 111, 229-233.
- Prestle, J., Schonfelder, M., Adam, G. und Mundry, K. W.** Type 1 ribosome-inactivating proteins depurinate plant 25S rRNA without species specificity. *Nucleic Acids Res* (1992) 20, 3179-3182.
- Prigent, J., Panigai, L., Lamourette, P., Sauvaire, D., Devilliers, K., Plaisance, M., Volland, H., Creminon, C. und Simon, S.** Neutralising antibodies against ricin toxin. *PLoS One* (2011) 6, e20166.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. und Gerst, J. E.** Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* (1993) 74, 855-861.
- Pust, S., Dyve, A. B., Torgersen, M. L., van Deurs, B. und Sandvig, K.** Interplay between toxin transport and flotillin localization. *PLoS One* (2010) 5, e8844.
- Quinones, B., Massey, S., Friedman, M., Swimley, M. S. und Teter, K.** Novel cell-based method to detect Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 and inhibitors of toxin activity. *Appl Environ Microbiol* (2009) 75, 1410-1416.
- Rabin, S. D. und Hauser, A. R.** *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun* (2003) 71, 4144-4150.
- Rapak, A., Falnes, P. O. und Olsnes, S.** Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94, 3783-3788.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F. und Marks, M. S.** Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* (2001) 152, 809-824.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. und Riezman, H.** *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* (1993) 120, 55-65.
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V. D., Latva-Ranta, M. und Ruddock, L.** A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* (2007) 179, 1193-1204.
- Rea, S. L., Graham, B. H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A. und Falk, M. J.** Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* (2010) 16, 200-218.
- Redinbaugh, M. G. und Turley, R. B.** Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* (1986) 153, 267-271.
- Redmann, V., Oresic, K., Tortorella, L. L., Cook, J. P., Lord, M. und Tortorella, D.** Dislocation of ricin toxin A chains in human cells utilizes selective cellular factors. *J Biol Chem* (2011) 286, 21231-21238.
- Reggiori, F., Wang, C. W., Stromhaug, P. E., Shintani, T. und Klionsky, D. J.** Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J Biol Chem* (2003) 278, 5009-5020.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K. und Parthier, B.** JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) 91, 7012-7016.
- Richardson, P. T., Westby, M., Roberts, L. M., Gould, J. H., Colman, A. und Lord, J. M.** Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA. *FEBS Lett* (1989) 255, 15-20.

- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y. D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D. G. und Jurgens, G. *Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling.* Nature (2007) 448, 488-492.
- Riffer, F., Eisfeld, K., Breinig, F. und Schmitt, M. J. *Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* Microbiology (2002) 148, 1317-1328.
- Roberts, L. M. und Lord, J. M. *The synthesis of Ricinus communis agglutinin, cotranslational and posttranslational modification of agglutinin polypeptides.* Eur J Biochem (1981) 119, 31-41.
- Roberts, L. M. und Smith, D. C. *Ricin: the endoplasmic reticulum connection.* Toxicon (2004) 44, 469-472.
- Robinson, M., Poon, P. P., Schindler, C., Murray, L. E., Kama, R., Gabriely, G., Singer, R. A., Spang, A., Johnston, G. C. und Gerst, J. E. *The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast.* Mol Biol Cell (2006) 17, 1845-1858.
- Rodriguez, G. C., Boente, M. P., Berchuck, A., Whitaker, R. S., O'Briant, K. C., Xu, F. und Bast, R. C., Jr. *The effect of antibodies and immunotoxins reactive with HER-2/neu on growth of ovarian and breast cancer cell lines.* Am J Obstet Gynecol (1993) 168, 228-232.
- Rogel, A. und Hanski, E. *Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane.* J Biol Chem (1992) 267, 22599-22605.
- Römisch, K. *Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane.* J Cell Sci (1999) 112, 4185-4191.
- Roth, J., Binder, M. und Gerhard, U. J. *Conjugation of lectins with fluorochromes: an approach to histochemical double labeling of carbohydrate components.* Histochemistry (1978) 56, 265-273.
- Rothstein, R. J. *One-step gene disruption in yeast.* Methods Enzymol (1983) 101, 202-211.
- Rutenber, E. und Robertus, J. D. *Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution.* Proteins (1991) 10, 260-269.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science (1988) 239, 487-491.
- Sander, N. *Untersuchungen zum intrazellulären Transport und zur in vivo Toxizität chimärer RTA/K28β Toxinfusionen in Hefe.* Diplomarbeit (2008), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A. B., Skotland, T. und Torgersen, M. L. *Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin.* Toxicon (2010a) 56, 1181-1185.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H. und van Deurs, B. *Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum.* Nature (1992) 358, 510-512.
- Sandvig, K., Olsnes, S. und Pihl, A. *Binding, uptake and degradation of the toxic proteins abrin and ricin by toxin-resistant cell variants.* Eur J Biochem (1978) 82, 13-23.
- Sandvig, K., Spilsberg, B., Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., Iversen, T. G. und van Deurs, B. *Pathways followed by protein toxins into cells.* Int J Med Microbiol (2004) 293, 483-490.
- Sandvig, K., Torgersen, M. L., Engedal, N., Skotland, T. und Iversen, T. G. *Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine.* FEBS Lett (2010b) 584, 2626-2634.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. *Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin.* Physiol Rev (1996) 76, 949-966.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. *Membrane traffic exploited by protein toxins.* Annu Rev Cell Dev Biol (2002a) 18, 1-24.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. *Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin.* FEBS Lett (2002b) 529, 49-53.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* 1977. Biotechnology (1992) 24, 104-108.
- Sato, K., Sato, M. und Nakano, A. *Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer.* J Cell Biol (2001) 152, 935-944.
- Schagger, H., Aquila, H. und Von Jagow, G. *Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.* Anal Biochem (1988) 173, 201-205.
- Schenborn, E. und Groskreutz, D. *Reporter gene vectors and assays.* Mol Biotechnol (1999) 13, 29-44.
- Schep, L. J., Temple, W. A., Butt, G. A. und Beasley, M. D. *Ricin as a weapon of mass terror--separating fact from fiction.* Environ Int (2009) 35, 1267-1271.
- Schiavo, G. und van der Goot, F. G. *The bacterial toxin toolkit.* Nat Rev Mol Cell Biol (2001) 2, 530-537.
- Schiestl, R. H. und Gietz, R. D. *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.* Curr Genet (1989) 16, 339-346.
- Schmitt, M. J. *Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast.* Mol Gen Genet (1995) 246, 236-246.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. und Herzog, V. *Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex.* J Cell Biol (2000) 148, 1203-1212.

- Schnöder, T.** *Untersuchungen zum intrazellulären Transportweg und der in vivo Toxizität von Ricin A (RTA) in Hefen.* Dissertation (2009), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M. A., Lenz, P. und Steinberg, G.** *Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes.* *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108, 3618-3623.
- Schwartz, T. U.** *Origins and evolution of cotranslational transport to the ER.* *Adv Exp Med Biol* (2007) 607, 52-60.
- Seaman, M. N.** *Recycle your receptors with retromer.* *Trends Cell Biol* (2005) 15, 68-75.
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M. und Emr, S. D.** *A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast.* *J Cell Biol* (1998) 142, 665-681.
- Sehgal, P., Khan, M., Kumar, O. und Vijayaraghavan, R.** *Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans.* *Food Chem Toxicol* (2010) 48, 3171-3176.
- Sehgal, P., Kumar, O., Kameswararao, M., Ravindran, J., Khan, M., Sharma, S., Vijayaraghavan, R. und Prasad, G. B.** *Differential toxicity profile of ricin isoforms correlates with their glycosylation levels.* *Toxicology* (2011) 282, 56-67.
- Sekine-Aizawa, Y. und Haganir, R. L.** *Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors.* *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101, 17114-17119.
- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N. und Pelham, H. R.** *ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway.* *Cell* (1990) 61, 1349-1357.
- Semenza, J. C. und Pelham, H. R.** *Changing the specificity of the sorting receptor for luminal endoplasmic reticulum proteins.* *J Mol Biol* (1992) 224, 1-5.
- Sendzik, T.** *Identifizierung essentieller Komponenten des intrazellulären Transports eines viralen A/B-Killertoxins der Hefe.* Doktorarbeit (2006), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. und Tsien, R. Y.** *A guide to choosing fluorescent proteins.* *Nat Methods* (2005) 2, 905-909.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. und Maizel, J. V., Jr.** *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.* *Biochem Biophys Res Commun* (1967) 28, 815-820.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. und Saiga, Y.** *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea.* *J Cell Comp Physiol* (1962) 59, 223-239.
- Sikorski, R. S. und Hieter, P.** *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.* *Genetics* (1989) 122, 19-27.
- Simmons, B. M. und Russell, J. H.** *A single affinity column step method for the purification of ricin toxin from castor beans (*Ricinus communis*).* *Anal Biochem* (1985) 146, 206-210.
- Simmons, B. M., Stahl, P. D. und Russell, J. H.** *Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for a chain translocation.* *J Biol Chem* (1986) 261, 7912-7920.
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D. H. und Lord, J. M.** *Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast.* *FEBS Lett* (1999) 459, 80-84.
- Simpson, J. C., Smith, D. C., Roberts, L. M. und Lord, J. M.** *Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin.* *Exp Cell Res* (1998) 239, 293-300.
- Siniosoglou, S., Peak-Chew, S. Y. und Pelham, H. R.** *Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p.* *Embo J* (2000) 19, 4885-4894.
- Siniosoglou, S. und Pelham, H. R.** *An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes.* *Embo J* (2001) 20, 5991-5998.
- Skanland, S. S., Walchli, S., Brech, A. und Sandvig, K.** *SNX4 in complex with clathrin and dynein: implications for endosome movement.* *PLoS One* (2009) 4, e5935.
- Slominska-Wojewodzka, M., Gregers, T. F., Walchli, S. und Sandvig, K.** *EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol.* *Mol Biol Cell* (2006) 17, 1664-1675.
- Smallshaw, J. E., Ghetie, V., Rizo, J., Fulmer, J. R., Trahan, L. L., Ghetie, M. A. und Vitetta, E. S.** *Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice.* *Nat Biotechnol* (2003) 21, 387-391.
- Smallshaw, J. E., Richardson, J. A. und Vitetta, E. S.** *RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol.* *Vaccine* (2007) 25, 7459-7469.
- Smallshaw, J. E. und Vitetta, E. S.** *Ricin vaccine development.* *Curr Top Microbiol Immunol* (2012) 357, 259-272.
- Smith, D. C., Gallimore, A., Jones, E., Roberts, B., Lord, J. M., Deeks, E., Cerundolo, V. und Roberts, L. M.** *Exogenous peptides delivered by ricin require processing by signal peptidase for transporter associated with antigen processing-independent MHC class I-restricted presentation.* *J Immunol* (2002) 169, 99-107.
- Smith, D. C., Spooner, R. A., Watson, P. D., Murray, J. L., Hodge, T. W., Amessou, M., Johannes, L., Lord, J. M. und Roberts, L. M.** *Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum.* *Traffic* (2006) 7, 379-393.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem* (1985) 150, 76-85.
- Smith, R. D., Willett, R., Kudlyk, T., Pokrovskaya, I., Paton, A. W., Paton, J. C. und Lupashin, V. V. *The COG complex, Rab6 and COPI define a novel Golgi retrograde trafficking pathway that is exploited by SubAB toxin*. *Traffic* (2009) 10, 1502-1517.
- Sokolowska, I., Walchli, S., Wegrzyn, G., Sandvig, K. und Slominska-Wojewodzka, M. *A single point mutation in ricin A-chain increases toxin degradation and inhibits EDEM1-dependent ER retrotranslocation*. *Biochem J* (2011) 436, 371-385.
- Spang, A., Herrmann, J. M., Hamamoto, S. und Schekman, R. *The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum*. *Mol Biol Cell* (2001) 12, 1035-1045.
- Spooner, R. A., Hart, P. J., Cook, J. P., Pietroni, P., Rogon, C., Hohfeld, J., Roberts, L. M. und Lord, J. M. *Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105, 17408-17413.
- Spooner, R. A., Smith, D. C., Easton, A. J., Roberts, L. M. und Lord, J. M. *Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins*. *Virology* (2006) 3, 26.
- Spooner, R. A., Watson, P. D., Marsden, C. J., Smith, D. C., Moore, K. A., Cook, J. P., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum*. *Biochem J* (2004) 383, 285-293.
- Stechmann, B., Bai, S. K., Gobbo, E., Lopez, R., Merer, G., Pinchard, S., Panigai, L., Tenza, D., Raposo, G., Beaumelle, B., Sauvage, D., Gillet, D., Johannes, L. und Barbier, J. *Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge*. *Cell* (2010) 141, 231-242.
- Stefan, A., Conti, M., Rubboli, D., Ravagli, L., Presta, E. und Hochkoeppler, A. *Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in Escherichia coli*. *J Biotechnol* (2010) 156, 245-252.
- Stillmark, H. *Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus communis L. und anderen Euphorbiaceen*. Doctoral thesis (1888), University of Estonia.
- Stirpe, F. *Ribosome-inactivating proteins*. *Toxicon* (2004) 44, 371-383.
- Storrie, B., Pepperkok, R. und Nilsson, T. *Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling*. *Trends Cell Biol* (2000) 10, 385-391.
- Streuli, C. H., Patel, B. und Critchley, D. R. *The cholera toxin receptor ganglioside GM remains associated with triton X-100 cytoskeletons of BALB/c-3T3 cells*. *Exp Cell Res* (1981) 136, 247-254.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. *J Mol Biol* (1986) 189, 113-130.
- Sturm, M. B. und Schramm, V. L. *Detecting ricin: sensitive luminescent assay for ricin A-chain ribosome depurination kinetics*. *Anal Chem* (2009) 81, 2847-2853.
- Szewczak, A. A., Moore, P. B., Chang, Y. L. und Wool, I. G. *The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90, 9581-9585.
- Sztul, E. und Lupashin, V. *Role of tethering factors in secretory membrane traffic*. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) 290, C11-26.
- Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L. und Hong, W. *Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network*. *Mol Biol Cell* (2004) 15, 4011-4022.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A. und Chandler, W. L. *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. *Lancet* (2005) 365, 1073-1086.
- Taylor, S., Massiah, A., Lomonosoff, G., Roberts, L. M., Lord, J. M. und Hartley, M. *Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection*. *Plant J* (1994) 5, 827-835.
- Tekle, C., Deurs, B., Sandvig, K. und Iversen, T. G. *Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands*. *Nano Lett* (2008) 8, 1858-1865.
- Teter, K. und Holmes, R. K. *Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation in CHO cells resistant to cholera toxin, Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, and ricin*. *Infect Immun* (2002) 70, 6172-6179.
- Tolia, N. H. und Joshua-Tor, L. *Slicer and the argonautes*. *Nat Chem Biol* (2007) 3, 36-43.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. *Biotechnology* (1992) 24, 145-149.
- Townsley, F. M., Wilson, D. W. und Pelham, H. R. *Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport*. *Embo J* (1993) 12, 2821-2829.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I. und Rapoport, T. A. *Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin*. *Cell* (2001) 104, 937-948.

- Tsai, B., Ye, Y. und Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3, 246-255.
- Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* (1998) 67, 509-544.
- Turturro, F. Denileukin diftitox: a biotherapeutic paradigm shift in the treatment of lymphoid-derived disorders. *Expert Rev Anticancer Ther* (2007) 7, 11-17.
- Ungar, D., Oka, T., Krieger, M. und Hughson, F. M. Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol* (2006) 16, 113-120.
- Utskarpen, A., Slagsvold, H. H., Iversen, T. G., Walchli, S. und Sandvig, K. Transport of ricin from endosomes to the Golgi apparatus is regulated by Rab6A and Rab6A'. *Traffic* (2006) 7, 663-672.
- Vallera, D. A., Chen, H., Sicheneder, A. R., Panoskaltis-Mortari, A. und Taras, E. P. Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy. *Leuk Res* (2009) 33, 1233-1242.
- Van Belzen, N., Rijken, P. J., Hage, W. J., de Laat, S. W., Verkleij, A. J. und Boonstra, J. Direct visualization and quantitative analysis of epidermal growth factor-induced receptor clustering. *J Cell Physiol* (1988) 134, 413-420.
- Van Deurs, B., Sandvig, K., Petersen, O. W., Olsnes, S., Simons, K. und Griffiths, G. Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol* (1988) 106, 253-267.
- Van Deurs, B., Tonnessen, T. I., Petersen, O. W., Sandvig, K. und Olsnes, S. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J Cell Biol* (1986) 102, 37-47.
- Vasandani, V. M., Madan, S. und Ghosh, P. C. In vivo potentiation of ricin toxicity by monensin delivered through liposomes. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1116, 315-323.
- Viel, T., Dransart, E., Nemati, F., Henry, E., Theze, B., Decaudin, D., Lewandowski, D., Boisgard, R., Johannes, L. und Tavitian, B. In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. *Mol Imaging* (2008) 7, 239-247.
- Vincent, M. J., Martin, A. S. und Compans, R. W. Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* (1998) 273, 950-956.
- Von Heijne, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* (1983) 133, 17-21.
- Von Heijne, G. Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* (1985) 184, 99-105.
- Von Heijne, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* (1986) 14, 4683-4690.
- Voos, W. und Stevens, T. H. Retrieval of resident late-Golgi membrane proteins from the prevacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the function of Grd19p. *J Cell Biol* (1998) 140, 577-590.
- Walch, B. "Delivery" funktioneller Nukleinsäuren in Antigen-präsentierenden Säugerzellen mittels rekombinanter Hefen. Dissertation (2009), Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Wales, R., Chaddock, J. A., Roberts, L. M. und Lord, J. M. Addition of an ER retention signal to the ricin A chain increases the cytotoxicity of the holotoxin. *Exp Cell Res* (1992) 203, 1-4.
- Wales, R., Roberts, L. M. und Lord, J. M. Addition of an endoplasmic reticulum retrieval sequence to ricin A chain significantly increases its cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem* (1993) 268, 23986-23990.
- Walsh, T. A., Morgan, A. E. und Hey, T. D. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem* (1991) 266, 23422-23427.
- Wang, C. T., Jetzt, A. E., Cheng, J. S. und Cohick, W. S. Inhibition of the unfolded protein response by ricin a-chain enhances its cytotoxicity in Mammalian cells. *Toxins (Basel)* (2011) 3, 453-468.
- Wang, H. B., Xia, F., Ge, J., Yin, J., Tan, L. S., Zhang, P. D. und Zhong, J. Co-application of ricin A chain and a recombinant adenovirus expressing ricin B chain as a novel approach for cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* (2007a) 28, 657-662.
- Wang, M., Yu, S., Wang, C. und Kong, J. Tracking the endocytic pathway of recombinant protein toxin delivered by multiwalled carbon nanotubes. *ACS Nano* (2010) 4, 6483-6490.
- Wang, P. und Tumer, N. E. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res* (2000) 55, 325-355.
- Wang, S. T., Hu, M. R., Guo, J. W., Feng, J. N. und Shen, B. F. [Fusion expression and purification of recombinant ricin A-chain]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* (2005) 21, 137-140.
- Wang, X., Li, X. und Li, Y. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett* (2007b) 29, 1599-1603.
- Warnier, M., Romer, W., Geelen, J., Lesieur, J., Amessou, M., van den Heuvel, L., Monnens, L. und Johannes, L. Trafficking of Shiga toxin/Shiga-like toxin-1 in human glomerular microvascular endothelial cells and human mesangial cells. *Kidney Int* (2006) 70, 2085-2091.
- Watson, P., Jones, A. T. und Stephens, D. J. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev* (2005) 57, 43-61.

- Wedin, G. P., Neal, J. S., Everson, G. W. und Krenzelok, E. P. *Castor bean poisoning*. *Am J Emerg Med* (1986) 4, 259-261.
- Welsh, L. M., Tong, A. H., Boone, C., Jensen, O. N. und Otte, S. *Genetic and molecular interactions of the Erv41p-Erv46p complex involved in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex*. *J Cell Sci* (2006) 119, 4730-4740.
- Wesche, J., Rapak, A. und Olsnes, S. *Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol*. *J Biol Chem* (1999) 274, 34443-34449.
- Weston, S. A., Tucker, A. D., Thatcher, D. R., Derbyshire, D. J. und Pauptit, R. A. *X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution*. *J Mol Biol* (1994) 244, 410-422.
- Wheatley, S. P. und Wang, Y. L. *Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells*. *Methods Cell Biol* (1998) 57, 313-332.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D. und Fitzpatrick, J. D. *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. *Anal Biochem* (1988) 175, 231-237.
- Wiest, D. L., Bhandoola, A., Punt, J., Kreibich, G., McKean, D. und Singer, A. *Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94, 1884-1889.
- Wilkins, M. E., Li, X. und Smart, T. G. *Tracking cell surface GABAB receptors using an alpha-bungarotoxin tag*. *J Biol Chem* (2008) 283, 34745-34752.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro*. *J Biol Chem* (1993) 268, 7465-7468.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. und Davis, R. W. *Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis*. *Science* (1999) 285, 901-906.
- Wright, H. T. und Robertus, J. D. *The intersubunit disulfide bridge of ricin is essential for cytotoxicity*. *Arch Biochem Biophys* (1987) 256, 280-284.
- Wu, C. J., Hsueh, P. R. und Ko, W. C. *A new health threat in Europe: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 infections*. *J Microbiol Immunol Infect* (2011) 44, 390-393.
- Xiao, G., Chung, T. F., Pyun, H. Y., Fine, R. E. und Johnson, R. J. *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. *Brain Res Mol Brain Res* (1999) 72, 121-128.
- Yang, T. T., Cheng, L. und Kain, S. R. *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. *Nucleic Acids Res* (1996) 24, 4592-4593.
- Yoshida, T., Chen, C. C., Zhang, M. S. und Wu, H. C. *Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and *Pseudomonas* toxin*. *Exp Cell Res* (1991) 192, 389-395.
- Youle, R. J. und Huang, A. H. *Protein Bodies from the Endosperm of Castor Bean: Subfractionation, Protein Components, Lectins, and Changes during Germination*. *Plant Physiol* (1976) 58, 703-709.
- Young, J. A. und Collier, R. J. *Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation*. *Annu Rev Biochem* (2007) 76, 243-265.
- Yu, M. und Haslam, D. B. *Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3*. *Infect Immun* (2005) 73, 2524-2532.
- Zabrocki, P., Bastiaens, I., Delay, C., Bammens, T., Ghillebert, R., Pellens, K., De Virgilio, C., Van Leuven, F. und Winderickx, J. *Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson*. *Biochim Biophys Acta* (2008) 1783, 1767-1780.
- Zanetti, G., Pahuja, K. B., Studer, S., Shim, S. und Schekman, R. *COPII and the regulation of protein sorting in mammals*. *Nat Cell Biol* (2011) 14, 20-28.
- Zernike, F. *How I discovered phase contrast*. *Science* (1955) 121, 345-349.
- Zhan, J., Chen, Y., Wang, K. und Zheng, S. *Expression of ricin A chain and ricin A chain-KDEL in *Escherichia coli**. *Protein Expr Purif* (2004) 34, 197-201.
- Zhan, J., Stayton, P. und Press, O. W. *Modification of ricin A chain, by addition of endoplasmic reticulum (KDEL) or Golgi (YQRL) retention sequences, enhances its cytotoxicity and translocation*. *Cancer Immunol Immunother* (1998) 46, 55-60.
- Zhao, L. und Haslam, D. B. *A quantitative and highly sensitive luciferase-based assay for bacterial toxins that inhibit protein synthesis*. *J Med Microbiol* (2005) 54, 1023-1030.
- Zhong, R. K., van de Winkel, J. G., Thepen, T., Schultz, L. D. und Ball, E. D. *Cytotoxicity of anti-CD64-ricin A chain immunotoxin against human acute myeloid leukemia cells in vitro and in SCID mice*. *J Hematother Stem Cell Res* (2001) 10, 95-105.

- Zhou, H. M., Brust-Mascher, I. und Scholey, J. M.** *Direct visualization of the movement of the monomeric axonal transport motor UNC-104 along neuronal processes in living Caenorhabditis elegans.* J Neurosci (2001) 21, 3749-3755.
- Zhu, H. und Bussey, H.** *The K1 Toxin of Saccharomyces cerevisiae Kills Spheroplasts of Many Yeast Species.* Appl Environ Microbiol (1989) 55, 2105-2107.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M. und Helms, V.** *Protein translocation across the ER membrane.* Biochim Biophys Acta (2010) 1808, 912-924.
- Zoja, C., Buelli, S. und Morigi, M.** *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction.* Pediatr Nephrol (2010) 25, 2231-2240.
- Zornetta, I., Brandi, L., Janowiak, B., Dal Molin, F., Tonello, F., Collier, R. J. und Montecucco, C.** *Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras.* Cell Microbiol (2010) 12, 1435-1445.

8. Veröffentlichungen

Publikationen

Becker, B. and Schmitt, M. J. Adapting yeast as model to study ricin toxin A uptake and trafficking. *Toxins* (2011) 3, 834-847.

Becker, B., Schnöder, T., Breinig, F., Schmitt, M. J. New yeast-based reporterassay reveals striking similarities between the trafficking of ricin A in yeast and ricin in mammalian cells. (Manuskript in Vorbereitung)

Poster

Becker, B. and Schmitt, M. J. Adapting yeast as a model to study ricin toxin A uptake and trafficking. VAAM-Jahrestagung, Tübingen (2012)

Becker, B. and Schmitt, M. J. Endocytosis and toxicity of ricin A in yeast. VAAM-Jahrestagung, Karlsruhe (2011)

Becker, B. and Schmitt, M. J. Chimeric toxins: a tool to study the endocytosis and the mode of action of ricin in yeasts. VAAM-Jahrestagung, Hannover (2010)

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Juni 2012

(Björn Becker)

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Manfred J. Schmitt, für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas und die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für ihr Interesse am Fortschritt meiner Experimente, ihre zahlreichen Anregungen und Kritiken sowie ihre aufmunternden Worte. Auch ihre tatkräftige Hilfe bei der Verbesserung der Publikationsmanuskripte hat wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Herzlichen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung bei der Bewilligung meines Graduiertenstipendiums.

Einen herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Bereitschaft, sich mit meinen Forschungsergebnissen auseinanderzusetzen. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Untersuchungen zum Sec61-Knockdown in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Nico Schäuble, der mich in die siRNA-Technik eingeführt und mich tatkräftig bei den Experimenten unterstützt hat. Vielen Dank für deine Hilfe, Geduld und konstruktiven Ideen. Ebenso gilt mein Dank der ganzen Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Björn Diehl (Ligator) für die einmalige Einweisung in den Laboralltag während der F- und Diplomarbeit, die Unterstützung bei meinen ersten wackligen Gehversuchen als Molekularbiologe (Stichwort: Western-Analyse), der Hilfe bei vielen kleinen bis ganz großen Computer-Problemen sowie für die schöne Laborzeit. Deine Mühen haben sich ausgezahlt: Ich bin ein kompetenter Molekularbiologe geworden.

Vielen Dank an meine Lieblings-Laborkollegen/in Thorsten Hoffmann, Nina Müller und Dr. Esther Giesselmann. Ihr seid einfach großartige Kollegen, die ich nie vergessen werde. Das Aufzählen alle lustigen und wahnwitzigen Momente würde den Rahmen sprengen. Vielleicht schreib ich mal ein Buch, wenn ich im betuchten Alter bin. Danke für die leckeren Nachtsche, das Korrekturlesen meiner Dissertation, die Hilfe bei der Durchflusszytometrie (gell Nina), die tollen Geburtstagsgeschenke, den hoffentlich schönen Doktorhut und den nie verlorenen Humor trotz teilweise deprimierender Ergebnisse. Vielen Dank auch an meinen Lieblings-Franzosen Guillaume Wendt, der mich mit seiner fröhlichen Art immer wieder zum Lachen gebracht und zum Joggen ("Laufbande") motiviert hat.

Bei Dr. Frank Breinig bedanke ich mich für die guten Ratschläge und Ideen zur Lösung meiner theoretischen und praktischen Probleme ("Ich hätte da mal noch eine Frage"). Danke auch für das Korrekturlesen der Manuskripte bzw. Dissertation sowie die erstklassige Beförderung zur VAAM-Tagung.

Einen herzlichen Dank auch an unsere (meine) Sekretärin Nicole Jundel, die sich hervorragend um bürokratische und private Anliegen gekümmert hat. Danke.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle meine ehemaligen und jetzigen Studenten Domenik Rammo, Senda Saddem und Lisa Stolz, die sich während ihrer F-Praktika, ihrer Diplom- oder Bachelor-Arbeiten mit großem Interesse und Einsatz an meiner Forschung beteiligt haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die freundliche und schnelle Bereitstellung von Antikörpern und Plasmiden danke ich Prof. Dr. L. Roberts, Prof. Dr. J. C. Cook, Prof. Dr. R. Zimmermann und Prof. Dr. V. Flockerzi.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Bernhard dafür bedanken, dass ich das FACS-Gerät nutzen durfte. Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Heinzle für die Möglichkeit, das Oxoplate-System zu testen und den Fluoreszenz-Reader nutzen zu dürfen. Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Giffhorn bedanke ich mich für die Möglichkeit, das Äkta-System verwenden zu können. Ebenso bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Römisch für die Bereitstellung des Isotopenlabors zur Durchführung der radioaktiven Markierungsversuche und ihrem Team für die Hilfe bei praktischen Problemen.

Bei Roswitha Schepp möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, die Übernahme einiger Klonierungsarbeiten sowie die weltbesten Weihnachtsplätzchen bedanken. Danke, dass du dir soviel Zeit für meine Anliegen genommen und ein erstklassiges Arbeitsumfeld im Säugerlabor geschaffen hast.

Der Graduiertenförderung der Universität des Saarlandes danke ich für finanzielle und fachliche Förderung im Rahmen meines Stipendiums. Ebenso danke ich auch Herrn Prof. Dr. J. Walter für die Erstellung des Stipendiumsgutachtens.

Ebenso vielen Dank an...

.....Dr. D. Müller, Dr. K. Hollemeyer und Georg Tascher für ihre Hilfe bei den Oxoplate-Messungen und der Maldi-TOF-Analyse.

Dr. G. Kohring für die Hilfe bei technischen und mikrobiologischen Fragen;

Leon Muijs für die Unterstützung am konfokalen Laserscanning Mikroskop sowie die hervorragende FACS-Einweisung.

.....die ehemaligen Weggefährten Dr. Julia Dausend und Dr. Silvia Boschi Bazan für eure ehrliche und hilfsbereite Art.

.....Dr. Tina Schnöder für die Unterstützung bei den radioaktiven Markierungsexperimenten sowie die telefonische Hilfe bei Ricin-relevanten Fragen.

.....Andrea Karrenbauer für deine Hilfe bei der Klonierung verschiedener Toxinvarianten

.....Klaus Witte bei der technischen Unterstützung bei der affinitätschromatographischen Reinigung der Toxinvarianten.

.....Marc Lind für die Mit-Betreuung während meiner Diplomarbeit und den Zuckerapfel.

.....den Rest der derzeitigen und ehemaligen Arbeitsgruppe Molekular- und Zellbiologie für das freundliche und tolle Arbeitsklima.

....meinen ehemaligen Biologielehrer, Herrn Wolfgang Schmidt, der mir die Biologie näher gebracht hat.

Zum Schluss möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, die einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben. Ich danke ganz herzlich meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben hat. Besonders meiner Mama danke ich von Herzen für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Liebe. Meiner Oma für die unzähligen Mittagessen, den Laptop-Kauf und die schöne Zeit Daheim. Meinem Bruder danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Hilfe bei zahllosen Umzügen. Du schaffst das Diplom auch! Meinem Onkel für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Meiner damaligen Freundin Sarah danke ich von ganzem Herzen für ihre entgegengebrachte Liebe und Unterstützung im Laufe meiner Promotion.

Mein letzter Dank geht an meinen verstorbenen Opa, der immer an mich geglaubt hat und letztendlich Recht hatte. Ich werd dir das nie vergessen.

Lebenslauf

Name: **Björn Becker**

Geburtsdatum: 05.06.1982

Geburtsort: Saarlouis

Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

seit Juli 2008	Promotion (LGFG-Promotionsstipendium des Saarlandes) am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Prof. Dr. M. J. Schmitt, Thema der Dissertation: „Untersuchungen zur Endozytose und zum intrazellulären Transport von Ricin A (RTA) in Hefe- und Säugerzellen“
----------------	--

Universitäre Ausbildung

2007 – 2008	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie Prof. Dr. M. J. Schmitt, Titel der Diplomarbeit: „Untersuchung zur Wirkungsweise von porcinem β -Defensin pBD-1 nach heterologer Expression in Hefen“
2002 – 2008	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Saarbrücken Abschluss: Diplom (1,3) Hauptfach: Molekular- und Zellbiologie

Schulische Laufbahn

1998 – 2001	Max-Planck-Gymnasium Saarlouis (Abitur: 2,0)
1992 – 1998	Kreisrealschule Saarlouis (Mittlere Reife: 1,3)
1988 – 1992	Albero-Grundschule Schwalbach/Saar